

厚生労働科学委託研究費  
医薬品等規制調和・評価研究事業

**ヒトiPS由来肝/小腸細胞による再現性のある薬物代謝酵素・  
トランスポーター等の薬物誘導性評価試験の開発**  
( H26-医薬 B - 一般-022 )

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石田 誠一

平成27(2015)年 3月

# 目次

## . 総括研究報告

研究の総括-----P.

iPS細胞由来細胞の薬物代謝酵素等の誘導性の評価・品質基準の作成・性状解析

石田 誠一

## . 分担研究報告

1. iPS細胞由来細胞の薬物代謝酵素等の誘導性の評価・品質基準の作成・性状解析-P.

石 田誠一

2. ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成-----P.

松永 民秀

3. ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成----- P.

桑 昭苑

4. iPSC由来細胞の性状解析と薬物代謝酵素等の誘導性予測モデルの構築----- P.

樋坂 章博

5. ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成-----P.

水口 裕之

6. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成-----P.

梅澤 明弘

## . 添付資料

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

研究の総括 ヒト iPS 細胞由来肝 / 小腸細胞による再現性のある薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験の開発

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第三室長  
石田 誠一

厚生労働省より公布予定の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（案）」によると、薬物の *in vitro* 酵素誘導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。しかし、試験に用いる細胞に関しては、未だ、肝臓細胞の場合はドナー間差（ロット差）や供給の不安定さ、小腸の場合は細胞標本の入手困難が問題となっている。本研究では、これら問題を克服する細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝 / 小腸細胞を用いた、薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行う。本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性を検討し、CYP1A、CYP2C9、CYP3A4 の誘導能を有する細胞を見出した。腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討し、腸管上皮細胞の成熟化を促進する化合物を見出すことが出来た。また、分化誘導された腸管上皮細胞は腸管上皮細胞マーカーを発現しており、CYP3A4 の発現と 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> による誘導能が認められた。また、OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

研究分担者		教授
松永 民秀	名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授	A. 目的 厚生労働省より公布予定の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（案）」によると、薬物の <i>in vitro</i> 酵素誘導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。しかし、試験に用いる細胞に関しては、未だ、肝臓細胞の場合はドナー間差（ロット差）や供給の不安定さ、小腸の場合
桑 昭苑	東京工業大学生命理工研究科・教授	
水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科・教授	
梅澤 明弘	独立行政法人国立成育医療研究センター研究所再生医療センター・センター長	
樋坂 章博	千葉大学大学院薬学研究院・	

は細胞標本の入手困難が問題となっている。本研究では、これら問題を克服する細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝/小腸細胞を用いた、薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行う。本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性、腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討した。また、薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

## B. 研究方法

### iPS 細胞由来肝細胞の培養

B 社、C 社より iPS 細胞由来肝細胞を入手した。培養は各社推奨するプロトコルに従った。50  $\mu$ M omeprazole (CYP1A2)、500  $\mu$ M phenobarbital (CYP2B6)、20  $\mu$ M rifampicin (CYP3A4) に曝露し、酵素誘導試験を行った。暴露期間終了後、RNA を回収し、各種遺伝子の発現を TaqMan probe による qPCR により測定した。

### iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化誘導

国立成育医療研究センターでヒト胎児肺繊維芽細胞(MRC5)より樹立された iPS 細胞株(Tic、Widndy)などを用いた。細胞の分化は、細胞免疫染色、FACS を用いて評価した。薬物代謝酵素誘導実験では、1  $\mu$ M -25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> を曝露した。ペプチドの取り込み実験では、-Ala-Lys-AMCA (蛍光ラベルされたジペプチド) を 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C でインキュベートした後、細胞内取り込みを顕微鏡下で観察した。電気膜抵抗値 (TEER) 測定実験では、24well のチャンバー (BD Falcon) 上で培養したヒト iPS 細胞小腸上

皮細胞および Caco-2 細胞における TEER 値を、Millicell (Merk millipore) を用いて測定した。

### iPS 細胞由来肝細胞のゲノム DNA のメチル化解析

調製したゲノム DNA のメチル化の解析は The Infinium Methylation Assay (Human Methylation 450) により行い、検出および定量化されたメチル化部位のデータを用いて同一群内の相関解析および細胞種間のメチル化部位の比較を行った (GeneSpring GX12.0, Agilent 社)。

### 臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する手法 (CR-Fg-IR 法) の開発

既報の臨床試験における相互作用による AUC と消失半減期の変化から、小腸における代謝の程度を評価する新しい方法 (DDI 法) (Hisaka A et al. Assessment of intestinal availability (FG) of substrate drugs of cytochrome p450s by analyzing changes in pharmacokinetic properties caused by drug-drug interactions. Drug Metab Dispos. 2014;42(10):1640-5) を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。

### 誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた薬物代謝酵素誘導能評価に関する基礎データ収集として、OECD Test

Guideline を検討した。

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/CYP-induction-PBTG-final-for-WNT-comments.pdf>

#### quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

ヒト肝臓由来 RNA は BioChain 社のものを用いた。

#### < 倫理面への配慮 >

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究の実施に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、および当機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する

### C. 結果

#### iPS 細胞由来肝細胞の酵素誘導評価

B 社の細胞において、Omeprazole により CYP1A1 が 20.4 倍、CYP1A2 が 5.8 倍、Rifampicin により CYP2C9 が 1.7 倍、CYP3A4 が 2.7 倍の発現誘導が観察された (n=3)。これらの遺伝子の発現に関与するレセプターは、薬物の暴露により発現誘導することはなかった。C 社のデータは RNA の回収率が悪かったために、Rifampicin により誘導したサンプルは n=1、その他は n=2 による結果である。Omeprazole により CYP1A2 の発現が 2.1 倍、Rifampicin により CYP2B6 の発現が 1.8 倍高くなったが、n 数が少ないため、この誘導が有意なものであるかを判断することができなかった。その他の薬物代謝酵素、レセプター、トランスポーターの薬物暴露による発現誘導は観察されなかった。

#### iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化誘導と機能評

#### 価

良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を平面培養系において無血清培地により分化誘導を行った。その分化誘導体に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ腸管上皮様構造を確認した。その固定標本に対して腸管細胞マーカーである CDX-2 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、腸管上皮様構造に CDX-2 陽性細胞が認められた。同様に E-CADHERIN も陽性となり腸管上皮様組織構造をとることが示唆された。

ヒト iPS 細胞からの腸管上皮細胞への分化誘導方法の最適化を検討したところ、ある化合物を加えることにより、分化誘導の日数の短縮が認められ、小腸への分化誘導効率が有意に上昇した。さらに、この化合物を用いて分化誘導した小腸上皮細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 を発現する細胞に分化することを確認した。薬物暴露による誘導性を薬物代謝酵素 CYP3A4、トランスポーターとして P-gp (MDR1/ ABCB1) の発現を指標として評価した。ビタミン D<sub>3</sub> 暴露により、CYP3A4 mRNA 量が上昇した。一方、P-gp の mRNA 量についてはほぼ変動しなかった。トランスウエル上でタイトジャンクションを形成できるかどうか調べるために、細胞膜抵抗値を測定したところ、300  $\cdot$ cm<sup>2</sup>程度の値を示した。なお、コントロールとして用いた Caco-2 細胞では約 400  $\cdot$ cm<sup>2</sup>であった。

分化の途中段階の細胞について解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞マーカーとしては CDX2 が指標とされるが、CDX2+細胞には SOX17+と SOX17-細胞が存在し、その中でも CDX2+SOX17+細胞が CYP3A4 や MDR1 などを発現する小腸上皮細胞へ分化することを見出した。また CDX2+SOX17-に関しては胎盤の細胞へ分化することを見出した。したがって、これ

らの結果から、CDX2 というマーカー単独だけでは、真の小腸上皮とは言えないことが明らかになった。CDX2 と同時に SOX17 を評価に使用し、CDX2+SOX17+細胞を指標として評価すれば、真の小腸上皮細胞であるといえる。

### 臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する手法 (CR-Fg-IR 法) の開発

DDI 法を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。その結果、CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。また、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。

### iPS 細胞由来肝細胞のゲノム DNA のメチル化解析

ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞との比較解析を進めた。全プローブデータによる hierarchical clustering を実施したところ、それぞれの細胞が比較的近くに分類された。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されていた。

### 誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

EU で実施されたヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた、チトクロ

ーム P450 (CYP) の誘導性試験に関する比較的大規模なバリデーション試験の結果に基づく OECD ガイドライン案 (OECE GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS : Draft Proposal for a New Performance Based Test Guideline : Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction in vitro test method) が公開された。ヒト iPSC 由来肝細胞の誘導性評価試験の雛形として、ガイドライン案を検討した。誘導評価のための被験物質としては、Prototypical inducers (□-naphthoflavone、phenobarbital、rifampicin)、Proficiency substances (carbamazepine、phenytoin、sulfipyrazone、bosentan) を用いていた。その他の点に関して、FDA、EMA、厚生労働省より出されているガイドライン(案)、ガイダンスと比較すると、誘導の評価指標が OECD ガイドライン案では酵素活性を採用しているのに対し、その他のものは mRNA を採用していた。また、OECD ガイドラインでは化合物暴露による酵素誘導の評価に濃度依存性を考慮しており、その他とは判断基準がより細かいものとなっていた。

### quantitative PCR (qPCR) 用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

リアルタイム PCR による遺伝子発現定量に用いる検量線の作成を検討した。BioChain 社より購入したヒト肝臓由来 RNA11 ドナー分を用いて、CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 の遺伝子発現を測定した。ドナー間で発現にばらつきがあった。そこで、特定のドナーの発現パターンに偏らないようにするため、複数のドナー RNA をプールして検量線用の RNA 標品とすることとした。

D. 考察

入手した iPS 細胞由来肝細胞はいずれも試験に用いる段階において、殆ど全ての細胞が敷石状の形状をしており、肝実質細胞へと分化していたと考えられる。B 社の細胞では、Omeprazole による CYP1A2 の発現誘導と Rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が観察され、薬物誘導性評価への応用に向けて期待できる結果が得られた。C 社の細胞では、明確な薬物代謝の誘導は観察できなかったが、基底状態において高い代謝活性が観察された。このことより、培地を含めた培養条件の検討により、明確な薬物代謝の誘導が観察できる条件を見つけることができるかもしれない。

生体内腸管組織は粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下組織、漿膜に分かれており、吸収、免疫、蠕動といった複雑な機能を有する臓器である。腸管組織は、発生・分化・機能において複雑な器官であるが、経口薬物代謝評価系構築のためにはその分化誘導系の構築は重要である。今回我々が見出した低分子化合物を用いて分化誘導させた細胞は、スクラーゼ-イソマルターゼをはじめとした腸管上皮細胞マーカーや P-gp、BCRP などの薬物トランスポーター、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 を発現していた。また、形態学的にも敷石状で腸管上皮細胞に類似した形態を示していたことから、この分化させた細胞は腸管上皮細胞様細胞であることが示唆された。さらに、薬物代謝酵素活性やペプチドの取り込み能に加え、1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> による誘導能も認められたことから、腸管上皮細胞に特異的な薬物動態学的機能を有する細胞であることも明らかとなった。以上のことから、我々がヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞様細胞は薬物の吸収や代謝だけでなく、誘導性評価のためのモデル細胞として

の有用性が示された。

CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、今回新規に確立された CR-Fg-IR 法に従うことで小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の誘導の寄与が明らかになれば、in vitro の情報からそれを予測する方法論の構築が始めて可能となる。

ゲノム DNA のメチル化の解析を進めた。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されており、ドナー間差があるがヒト初代培養肝細胞としてのゲノムメチル化パターンが抽出できると考えられた。

薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に関しては、OECD ガイドライン案に提示されている 7 種の化合物の誘導性評価における有用性を今後検討していく必要がある。また、FDA、EPA、厚生労働省から提示されている CYP 酵素誘導に関する薬物 薬物相互作用に関連するガイドライン（案）では酵素誘導を RNA で評価することが提案されている。一方、今回参考とした OECD ガイドライン案では代謝酵素活性を指標としている。酵素誘導の分子機構とも考え併せて、今後班内でディスカッションが必要と考える。

複数ドナーのヒト肝臓由来の市販 RNA をプールして用いることで、ヒト肝臓における発現量と相対的に発現比較ができるように測定系を設定した。今回作成した RNA プールを検量線に用いることで、相対的発現量が 1 前後の遺伝子は、ヒト成人肝臓での発現にほぼ相当すると考えられる。

#### E. 結論

細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝 / 小腸細胞を用いた薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行った。その結果、本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性を検討し、CYP1A、CYP2C9、CYP3A4 の誘導能を有する細胞を見出した。腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討し、腸管上皮細胞の成熟化を促進する化合物を見出すことが出来た。また、分化誘導された腸管上皮細胞は腸管上皮細胞マーカーを発現しており、CYP3A4 の発現と 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> による誘導能が認められた。OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

#### F. 健康危機情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

1) Zeiger E, Gollapudi B, Aardema MJ, Auerbach S, Boverhof D, Custer L, Dedon P, Honma M, Ishida S, Kasinski AL, Kim JH, Manjanatha MG, Marlowe J, Pfuhrer S, Pogribny I, Slikker W, Stankowski LF Jr,

Tanir JY, Tice R, van Benthem J, White P, Witt KL, Thybaud V.: Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. *Environ Mol Mutagen.*, 2014; doi: 10.1002/em.21923.

- 2) Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T: Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos*, 2014; 42: 1947-1954.
- 3) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitors promote hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*, 2014; 9: e104010.
- 4) Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, Matsunaga T: Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; 29: 407-413.
- 5) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab*

- Pharmacokinet, 2014; 29: 237-243.
- 6) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; 29: 44-51.
  - 7) 松永民秀, 岩尾岳洋: 多能性幹細胞 (ES細胞, iPS細胞) の利用. 薬剤学実験法 必携マニュアル-Pharmaceutical Scientist のために- II 生物薬剤学, 日本薬剤学会出版委員会編, 南江堂, 東京, 2014年; p. 299-311.
  - 8) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. "Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation", *Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series)* (Edited by Kursad Turksen), in press
  - 9) Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in "iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation -Methods and Protocols" *Methods Mol Biol.* 2014 [Epub ahead of print]
  - 10) Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, *Methods Mol Biol.* 2014 Nov 20. Epub. in "ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition" [Epub ahead of print]
  - 11) Shiraki N, Ogaki S, Kume S\*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud.* 11(1):102-14, 2014.
  - 12) Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 394-408, 2014.
  - 13) Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S\*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19, 780-794, 2014.
  - 14) 白木伸明 桑昭苑 「ES/iP細胞を用いた内胚葉細胞 (膵、肝、小腸) への分化誘導」 『iPS細胞研究最前線-疾患モデルから臓器再生まで』 医学のあゆみ」251, 1153-1159, 2014.(長船健二 編集)
  - 15) 坂野大介 桑昭苑 「ES細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 器官の発生と再生の基礎』 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団(医学書院) 生体の科学 65. 197-202, 2014. 6月
  - 16) 白木伸明 桑昭苑 「メチオニンの代謝はヒトのES細胞およびiPS細胞の未分化維持および分化を制御している」『First Author's <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>
  - 17) Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.: A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014; 111: E5292-5301.
  - 18) Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC,

Wang HC, Umezawa A.: Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.*, 2015; 95: 26-42.

- 19) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.: A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.*, 2014; 9: e110496.
- 20) Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.: A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.*, 2015; 95: 4-13.
- 21) Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.: Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.*, 2014; 4: 5421.
- 22) Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.: The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.*, 2015; 87: 233-238.
- 23) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K.: Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.*, 2014; 10: 632-639.
- 24) Toyoda M, Umezawa A.: Stem cells bond our organs/tissues and engineering products.

*Circ J.*, 2014; 78: 1582-1583.

#### 学会発表等

- 1) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬剤毒性評価技術の最前線、CPhI Japan 2015 (国際医薬品原料・中間体展) (2014,4,東京)
- 2) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞の創薬応用の現状とその有効活用のための周辺技術、日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014,5,東京)
- 3) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価、動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 (2014,9,札幌)
- 4) 石田誠一：ヒト iPS 細胞由来肝細胞の技術的課題、CBI 学会 2014 年大会 (2014,10,東京)
- 5) Seiichi Ishida, Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Su-Ryang Kim, Yuko Sekino : Evaluation of Human iPS cell-derived Hepatocytes for the Application to ADME/Tox Tests in Drug Development、CBI 学会 2014 年大会 (2014,10,東京)
- 6) 石田誠一：肝臓の代謝酵素誘導評価法の確立、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて (2014,12,東京)
- 7) Matsunaga T, Utility of iPS cells for drug metabolizing enzyme expression. 29th JSSX Meeting - 19th North American ISSX joint meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 8) 壁谷知樹,岩尾岳洋,小玉菜央,中村克徳,松永民秀：ヒト iPS 細胞由来小腸幹細胞の

- 至適培養法の開発.第66回日本生物工学会大会(2014.9,札幌).1) 白木伸明「ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝臓を分化誘導する方法の開発」第11回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会(H26.12.9.東京)
- 9) 白木伸明『幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み』ワークショップ(原孝彦・糸昭苑オーガナイザー)第37回日本分子生物学会(H.26.11.26 横浜)
- 10) 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、糸 和彦、遠藤 文夫、糸昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第37回日本分子生物学会(H.26.11.26 横浜)
- 11) Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S. “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 12) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/ iPS cells” Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 13) Otera K, Ogaki S, Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 14) 糸昭苑「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成26年7月12日(東京)
- 15) Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
- 16) Kume S “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13,2014)
- 17) Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. 第12回幹細胞シンポジウム福岡(12th SCRS-Fukuoka) May 30-31, 2014.
- 18) 小澤 辰哉、高山 和雄、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之、薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製、第37回日本分子生物学会、横浜、2014年11月
- 19) 三木卓也、脇谷晶一、阿久津英憲、梅澤明弘、西野 光一郎.: ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析 (DNA methylation kinetics in the state transition of human iPS cells). 第8回日本エピジェネティクス研究会(2014.5, 東京).
- 20) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.: Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 12th

Annual Meeting of ISSCR (2014.6, Vancouver, Canada).

- 21) 樋坂章博. 薬物吸収時の小腸の代謝および輸送の定量的解析. 第5回杉山研究室(理研)公開シンポジウム(2015.2, 横浜).
- 22) Nakamura M, Koh S, Hisaka A, Suzuki H. Systematic Assessment of Intestinal Metabolism and Degree of Inhibition in Drug-drug interactions caused by Inhibition of CYP3A. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT) 2015 Annual Meeting (2015.3, New Orleans, USA).

#### 報道発表等

- 1) TOP STORY として論文の紹介 ESC & iPSC News 9.25 July 2, 2014 Web ニュース <http://s1832.t.en25.com/e/es.aspx?s=1832&e=123108&elq=ceb3aa38f4034b5d8ab46b1081cf4f3f>
- 2) 科学新聞「ヒト iPS / ES 細胞 メチオニン除去培養液で効率的に分化」2014. 4.25
- 3) 熊本日日新聞「ヒト iPS、ES 細胞効率分化 熊本大研究所グループ メチオニン除去培養液を使用」2014. 4.23.
- 4) 朝日新聞(熊本版)(生活面)『熊本大・白木助教と糸教授 アミノ酸組成着目「簡便な方法」発見』2014. 4.19.
- 5) 朝日新聞全国版「万能細胞培養の効率アップ熊本大などのチームが発見」2014. 4.18.
- 6) 日経産業新聞「iPS・ES 細胞分化防ぐ ヒトのアミノ酸発見 熊本大・東大」2014. 4.18.
- 7) 読売新聞熊本版「iPS 分化、効率的に 熊本大研究者ら成功 アミノ酸の働きで」2014.

4.18.

- 8) NHK ニュース 2014. 4.18. 6時55分
- 9) KKT テレビタミン 2014. 4.18.18時20分
- 10) RKK 夕方いちばん 2014. 4.18. 18時19分

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 松永民秀, 岩尾岳洋「人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法」国際出願番号:PCT/JP2014/054379, 国際出願日:2014年2月24日.
- 2) 糸 昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木恭子、糸 和彦、馬渡一徳「アミノ酸組成変更培地を用いた幹細胞の分化促進方法、及び該方法を用いて処理された幹細胞、並びに培地」特願 2014-32068 出願日:2014年9月10日

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 iPS 細胞由来細胞の薬物代謝酵素等の誘導性の評価・品質基準の作成・  
性状解析

担当責任者 石田誠一 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
薬理部 第三室長

研究要旨

薬物性肝障害評価に iPS 細胞由来肝細胞を利用するため、現在利用できる肝細胞は十分に分化誘導がされているのかについて、我々は市販 iPS 細胞由来肝細胞をモデルとして酵素誘導能を指標に検討した。そのために 3 社（A 社、B 社、C 社）より iPS 細胞由来肝細胞を入手した。2 社（B 社、C 社）より入手した iPS 細胞由来肝細胞は良好な最終分化過程を経て、均一な肝実質細胞様の形状へと変化した。B 社の細胞では、Omeprazole による CYP1A1、CYP1A2 の発現誘導と Rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が観察され、薬物誘導性評価においてヒト初代培養肝細胞に代わる細胞として期待できる。C 社の細胞では、基底状態において高い代謝活性が観察されたが、明確な薬物代謝の誘導は観察できなかった。C 社の細胞は基底状態における代謝活性が高いために、薬物暴露による代謝誘導が生じづらい状況にあるのかもしれない。そこで、基底状態の代謝活性が低下するような培養条件を見つけることにより、C 社の細胞においても明確な薬物代謝の誘導が生じることが期待される。

ゲノム DNA のメチル化の解析では、結果を hierarchical clustering することにより、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞を分類することができた。また、quantitative PCR に用いる検量線を検討したところ、8 ドナーのヒト肝細胞由来 RNA を使用することにより、発現量をヒト肝細胞と比較することが可能となった。OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手した。

研究協力者

堀内 新一郎 国立医薬品食品衛生研究所  
非常勤職員

導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。現在、肝臓に関しては、移植不適合肝臓から調製されたヒト肝細胞が試験に多用されているが、ドナー間差や調製間差によるばらつき、供給の安定性、倫理面などの問題があり、小腸に関しては、細胞標本を入手

A. 研究目的

厚生労働省より公布予定の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（案）」によると、薬物の in vitro 酵素誘

することが困難であるのが現状である。これらの問題を克服する細胞資源として、ヒト iPS 細胞由来肝 / 小腸細胞が期待できる。ヒト iPS 細胞は 2007 年に山中らにより樹立された細胞 (Cell 131: 861-872) で、胚性幹細胞とほぼ同等の性質が確認されている。近年、iPS 細胞を出発材料とする分化誘導研究が加速しており、現在 3 社よりヒト iPS 細胞由来肝細胞が入手可能となっている。今後は、様々な方法により作成された分化誘導肝 / 小腸細胞が現れることが予想される。このような分化誘導肝 / 小腸細胞を用いて薬物誘導性評価を行う際には、試料である分化誘導細胞の規格化が重要になってくる。本研究では iPS 細胞由来肝細胞の安全性評価応用を検討してきた研究者らが連携し、薬物誘導性評価のために iPS 細胞由来肝 / 小腸細胞が満たすべき品質基準の作成と、CYP3A4 などの薬物代謝酵素と P-gp (MDR1/ABCB1) などのトランスポーターの誘導性を mRNA レベルで評価するプロトコルの整備を目指している。

本年度、肝細胞に関しては、A 社、B 社、C 社より iPS 細胞由来肝細胞を入手し、各種薬剤による薬物代謝の誘導を遺伝子発現レベル、酵素活性レベルで観察した。誘導に関しては、ガイドラインに従い CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 を中心に検討した。

## B. 研究方法

### 細胞培養条件

B 社、C 社のいずれも凍結細胞を購入し、マルチウェルプレートに播種し培養を行った。細胞培養は各社指定の方法に従って行った。

B 社：細胞は解凍後、直ちに Plating medium に懸濁してマルチウェルプレートへ播種した。細胞を播種した 3 時間後に、張り付いていない

細胞を取り除くために培地交換を行い、その後は試験の日まで毎日培地交換を行った。その際の培地は、5 日目までが Plating Medium、5~6 日目が Maintenance Medium、6~9 日目が Assay Medium を用いた。培養に用いた培地の組成は表 1 に示した。

C 社：細胞は解凍した後、Thawing Medium に懸濁して室温 (15-25 ) で 15-20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を Plating Medium に置換して細胞をマルチウェルプレートへ播種した。播種翌日にウェルを 2 回洗浄した後、Enhanced hiPS-HEP Maintenance medium に交換した。その後、播種 3 日目に培地交換し、5 日目以降は毎日培地交換を行った。培養に用いた培地の組成は表 2 に示した。

### CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 誘導

iPS 細胞由来肝細胞を各薬剤に一定期間曝露した。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル) で行った。曝露濃度と曝露期間は以下に示す通り。

CYP1A2 : 50 μM omeprazole, 1day

CYP2B6 : 500 μM phenobarbital, 2 days

CYP3A4 : 20 μM rifampicin, 2 days

### P450-Glo による酵素活性測定

CYP3A4、CYP1A2 の酵素活性を P450-Glo™ Assay (Promega 社) により測定した。測定は添付の資料に従って行った。P450-Glo の測定結果は CellTiter-Glo によって測定した生存活性で除することによって規格化した。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル) で行った。

### 遺伝子発現

細胞からの RNA の抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN 社) を用いて行った。調製した total

RNA は、TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems 社)を用い、添付の方法に従い、Oligo dT(16)をプライマーとして逆転写した。逆転写産物は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)と各種遺伝子に特異的な TaqMan プライマー(Applied Biosystems 社)を用いて以下の遺伝子の発現を ViiA™7 real time PCR system (Applied Biosystems 社)により発現量を測定した。検量線には、BioChain 社から購入したヒト肝由来 RNA8 ドナーをプールしたものをを用いた。

CYP1A1 ( Hs01054797\_g1 )  
CYP1A2 ( Hs00167927\_m1 )  
CYP2B6 ( Hs04183483\_g1 )  
CYP2C9 ( Hs00426397\_m1 )  
CYP2C19 ( Hs00426380\_m1 )  
CYP3A4 ( Hs00430021\_m1 )  
CYP3A7 ( Hs00426361\_m1 )  
GSTA2 ( Hs00747232\_mh )  
UGT1A1 ( Hs01589938\_m1 )  
ABCB1 ( Hs00184500\_m1 )  
ABCC2 ( Hs00166123\_m1 )  
AHR ( Hs00169233\_m1 )  
PXR ( Hs00243666\_m1 )  
CAR ( Hs00230813\_m1 )  
CEBPA ( Hs00269972\_m1 )  
HNF4 ( Hs00230853\_m1 )

### ゲノム DNA のメチル化解析

・細胞の培養とゲノム DNA の調製

A (Reprocell)社の ReproHepato 細胞および B 社の iCell Hepatocyte、C (Celartis)社の hiPS-HEP 細胞の 3 種の iPS 細胞由来肝細胞を使用した。各細胞は、マルチウェルプレートに播種後、各社指定の方法により培養した。細胞か

らの DNA の調製は、AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen 社)を用いて行った。

・メチル化の解析

調製したゲノム DNA のメチル化の解析は The Infinium Methylation Assay ( Human Methylation 450 ) により行い、検出および定量化されたメチル化部位のデータを用いて同一群内の相関解析および細胞種間のメチル化部位の比較を行った ( GeneSpring GX12.0, Agilent 社 )。

### 誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた薬物代謝酵素誘導能評価に関する基礎データ収集として、OECD Test Guideline を検討した。

OECE GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS  
Draft Proposal for a New Performance Based Test Guideline

Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction  
*in vitro* test method

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/CYP-induction-PBTG-final-for-WNT-comments.pdf>

### quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

・ヒト肝臓由来 RNA は BioChain 社のものをを用いた。

Product Code: CBR1234149

Lot:

1. A602084 (Asian, 30, M)
2. A610220 (Asian, 24, M)
3. A507018 (Asian, 64, M)
4. A610219 (Asian, 24, M)

5. A605073 (Asian, 24, M)
  6. A801051 (Asian, 27, M)
  7. A801128 (Asian, 33, M)
  8. A801129 (Asian, 26, M)
  9. A801130 (Asian, 29, M)
  10. A801136 (Caucasian, 70, F)
  11. A801137 (Caucasian, 59, M)
- ・qPCR に用いた TaqMan プライマー
- CYP3A4 : Hs00430021\_m1  
CYP1A2 : Hs00167927\_m1  
CYP2B6 : Hs00167937\_g1  
CYP2C19 : Hs00426380\_m1  
CYP2C8 : Hs00258314\_m1  
CYP2C9 : Hs00426397\_m1  
CYP2D6 : Hs00164385\_m1

< 倫理面への配慮 >

該当なし

## C. 研究結果

### B 社の hiPS 細胞由来肝実質細胞

細胞は解凍後、研究方法に記述した方法でマルチウェルプレートに播種した(図1)。播種2日目までは、丸い形状の分化が未熟な細胞が多く存在していた(図2)。この丸い形状の細胞は、液滴の落下によって剥がれてしまうくらい接着が脆弱なため、培地交換に慎重を要した。播種3日目になると、接着が脆弱であった丸い形状の細胞がプレートにしっかりと接着し、肝実質細胞様の形状(敷石状)へと変化した。その後、播種6日目までの間に、より肝実質細胞様の形状へと変化し、播種6日目から試験日までは肝実質細胞様の形状を維持していた。また、プレートに貼り付いている細胞は均一な形状をしていたが、C社と比較すると、丸い形状の細胞が多く重層していた。

### C 社の hiPS 細胞由来肝実質細胞

細胞は解凍後、研究方法に記述した方法でマルチウェルプレートに播種した(図3)。B社とは異なり、播種1日目には細胞がしっかりプレートに接着していた(図4)。しかし、この時点において、細胞は敷石状の形状を成しておらず、播種5日目までの間に、徐々に分化して肝実質細胞様の形状(敷石状)へと変化した。5日目から試験日までは肝実質細胞様の形状を保っていた。また、細胞は均一な形状していたが、所々に細胞の塊が存在していた。

### B 社の細胞における薬物代謝酵素の発現誘導

B社は播種後9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素(CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A7、GSTA2)とその核内受容体(AhR、PXR、CAR)の発現を測定した。測定された発現値は、 $\beta$ -actinの発現値で徐することによって規格化を行った。なお、B社のデータはn=3による結果である。結果を図5-9に示した。B社の細胞において、OmeprazoleによりCYP1A1が20.4倍、CYP1A2が5.8倍、RifampicinによりCYP2C9が1.7倍、CYP3A4が2.7倍の発現誘導が観察された。これらの遺伝子の発現に関与するレセプターは、薬物の暴露により発現誘導されることはなかった。

### C 社の細胞における薬物代謝酵素の発現誘導

播種後8日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現(CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、CYP3A7)とその核内受容体(AhR、PXR、CAR)を測定した。測定された発現値は、 $\beta$ -actinの

発現値で徐することによって規格化を行った。なお、C社のデータはRNAの回収率が悪かったために、Rifampicinにより誘導したサンプルはn=1、その他はn=2による結果である。結果を図10-13に示した。OmeprazoleによりCYP1A2の発現が2.1倍、RifampicinによりCYP2B6の発現が1.8倍高くなったが、n数が少ないため、この誘導が有意なものであるかを判断することができなかった。その他の薬物代謝酵素、レセプター、トランスポーターの薬物暴露による発現誘導は観察されなかった。

### C社の細胞における薬物代謝活性

P450-Gloキットを用いて、酵素反応を1時間、または2時間行い、CYP1A2とCYP3A4の酵素活性を測定し、OmeprazoleとRifampicinによる酵素活性の誘導を観察した。また、以前に当研究室で測定したHepaRGにおける基底状態の酵素活性と比較した。HepaRGはヒト肝実質細胞と同程度の酵素活性が確認されており（Drug Metab Dispos. 2008, 36, 1444）C社の細胞におけるCYP1A2はHepaRGの約1/3、CYP3A4はHepaRGの約1/9であった（図14）。次に細胞をOmeprazoleとRifampicinに暴露した後、酵素活性をコントロール細胞（DMSOのみで処理）と比較することにより、酵素活性の誘導を評価した。CYP1A2の酵素活性がOmeprazoleへの曝露により約1.5倍有意に誘導した（P値=0.008）。Rifampicinへの曝露によるCYP3A4の酵素活性の誘導は観察できなかった。

### ゲノムDNAのメチル化解析

市販iPS細胞由来肝細胞について、分化誘導過程の細胞と分化が完了した細胞でのゲノムメチル化の解析を行っている（解析中のためdata not shown）。ヒト初代培養肝細胞、HepaRG

細胞、HepG2細胞との比較解析を進めた。全ブローブデータによるhierarchical clusteringを実施したところ、それぞれの細胞が比較的近くに分類された（図15）。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されていた。

### 誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

EUで実施されたヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞HepaRGを用いた、チトクロームP450（CYP）の誘導性試験に関する比較的大規模なバリデーション試験の結果に基づくOECDガイドライン案（OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal for a New Performance Based Test Guideline: Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction *in vitro* test method）が公開された。ヒトiPS細胞由来肝細胞の誘導性評価試験の雛形として、ガイドライン案を検討した。

概要を記す。

#### ○ 対象とする細胞：

- ・ヒト初代培養肝細胞（3ドナー由来）
- ・HepaRG細胞（3バッチ）

#### ○ 対象とするCYP：

- ・CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 核内受容体（AhR、PXR、CAR）による活性化機構に基づき選択。

#### ○ 測定方法：

- ・LC/MSによる活性測定（1）

#### ○ 試薬の濃度設定手順

1. 溶解性の確認
2. 毒性の確認（CellTiter Blue:Promega）
3. 濃度設定、公比1:1.5、、1:3

#### 誘導反応条件

- ・HepaRG：誘導時間48時間

・ cryo Hep : 誘導時間 72 時間

#### ○試験成立の条件

・ Prototypical inducers (  $\beta$ -naphthoflavone、phenobarbital、rifampicin ) で  $\geq 2$  倍の誘導があること

・ Proficiency substances ( carbamazepine、phenytoin、sulfipyrazone、bosentan ) の誘導性があること

#### ○ 評価方法

・ definable measures : n 倍誘導性

・ observations : 用量作用曲線 ( 2 )

既に公開されている、FDA、EPA、厚労省のガイドラインと比較した差異 ( の箇所 ) について記す。

1 : いずれのガイドラインでも mRNA による測定を採用している。

2 : 要請対象とする誘導剤の暴露濃度は 1 点となっている。

#### quantitative PCR (qPCR) 用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

リアルタイム PCR による遺伝子発現定量に用いる検量線の作成を検討した。BioChain 社より購入したヒト肝臓由来 RNA11 ドナー分を用いて、CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 の遺伝子発現を測定した ( 図 16 )。ドナー間で発現にばらつきがあった。そこで、特定のドナーの発現パターンに偏らないようにするため、複数のドナー RNA をプールして検量線用の RNA 標品とすることとした。その際、特に、複数の CYP 遺伝子で特にばらつきの大きかった

8. A801129 (Asian, 26, M)

10. A801136 (Caucasian, 70, F)

11. A801137 (Caucasian, 59, M)

の 3 ドナーに由来する RNA は、プールから外し

た。

B 社の細胞において誘導が確認された遺伝子について、この検量線を用いて発現値 ( ACTIN により規格化していない値 ) を求めた ( 図 17 )。CYP1A1 の発現値は、大きく 1 を超えており、また Rifampicin に暴露した際の CYP3A4 の発現値は、約 1 であった。CYP1A2 の値は、大きく 1 を下回っていた。

#### D. 考察

C 社の細胞は 5 日目以降、B 社は 6 日目以降、プレートに接着している殆ど全ての細胞が肝実質細胞様の形状へと変化しており、均一な分化が行われたものと考えられる。播種直後の B 社の細胞は、C 社と比較して分化が未熟な細胞が多く存在した。このため播種直後の B 社の細胞は、接着が非常に弱く、剥がれやすいため、この間の培地交換は非常に慎重に行う必要がある。ただし、B 社の細胞も 3 日目以降は接着が強固になり、C 社の細胞と同様に培地交換を行えるようになった。

B 社の細胞では、Omeprazole により CYP1A1 が 20.4 倍、CYP1A2 が 5.8 倍、Rifampicin により CYP2C9 が 1.7 倍、CYP3A4 が 2.7 倍の発現誘導が観察された。また、BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を使用した検量線より求めた発現値が、CYP1A1 が 1 以上、CYP3A4 が約 1 であったことから、発現量もヒト肝細胞と比較して遜色のないものであったと言える。このことより B 社の細胞は薬物誘導性評価への応用へ向け、大いに期待できると考えられる。

C 社の細胞では、基底状態における代謝酵素活性が、HepaRG と比較して CYP1A2 が約 1/3、CYP3A4 が約 1/9 と比較的に高い値であった。また、基底状態の薬物代謝酵素の発現も、B 社と比較して高い値 ( CYP1A1 : 148.5 倍、CYP1A2 : 8

倍、CYP2B6 : 68 倍)であった。しかし、C社の細胞における薬物代謝の誘導は、酵素活性レベルでOmeprazoleによる約1.5倍のCYP1A2の誘導が観察できたただけだった。このことより、C社の細胞は、基底状態における代謝活性が高く、薬物暴露による代謝誘導が生じづらい状況にあるのかもしれない。そこで基底状態の代謝活性を下げるような培養条件(培地の組成など)を検討することによって、薬物暴露による代謝誘導が大きくなる条件を見出すことができるかもしれない。また、mRNAレベルにおいてOmeprazoleによりCYP1A2の発現が2.1倍、RifampicinによりCYP2B6の発現が1.8倍高い値になっていたが、n数が少ないために、有意な誘導であるかを判断することができなかった。このために、n数を増やして再度実験を行う必要がある。

ゲノムDNAのメチル化のデータをhierarchical clusteringにより解析したところ、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG細胞、HepG2細胞がそれぞれ近くに分類され、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG細胞、HepG2細胞をクラスターに分類することができた。これらの細胞間でのクラスターの差異を調べることにより、細胞間における薬物代謝能の違いの原因を解明できるかもしれない。

本研究では誘導能予測モデル開発のために、ヒトiPS細胞由来肝細胞の誘導性評価試験に対するガイドライン案を提示することを1つの目的としている。ヒトiPS細胞由来肝細胞の誘導性評価試験に対するガイドライン案の作成にあたり、ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞HepaRGを対象とした試験結果より作成されたOECDガイドライン案を検討したところ、FDA、EPA、厚労省のガイドラインとの差異があった。酵素誘導の指標として、OECDガイドライ

ン案では代謝酵素活性を用いているのに対して、FDA、EPA、厚生労働省のガイドラインではmRNAの測定を用いている。酵素誘導の評価方法として、どちらの指標が適しているかを分子機構とも考え併せて、今後班内でディスカッションが必要と考える。また、薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定するにあたり、OECDガイドライン案に提示されている7種の化合物の誘導性評価における有用性を今後検討していく必要がある。

qPCRの検量線を作成するために、BioChain社のヒト肝臓由来RNAを用いてCYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6の遺伝子発現を測定したところ、(11ドナー中)3ドナーがその他のドナーと比較して、遺伝子発現のパターンが大きく異なっていた。これら3ドナーは正常のヒト肝臓細胞における薬物代謝遺伝子の発現を反映していないと推察される。また、比較的遺伝子発現パターンが近かった8ドナーに関しても、個別の遺伝子発現にはばらつきがあった。しかし、これらは正常なヒト肝細胞におけるばらつきの範囲内であると仮定し、これら8ドナーのRNAをプールして使用することにより、検量線の値が特定のドナーの発現パターンに偏らないようにでき、より平均的なヒト肝細胞における遺伝子発現を反映できると考えられる。

## E. 結論

どちらの細胞も試験に用いる段階において、殆ど全ての細胞が敷石状の形状をしており、肝実質細胞へと分化していたと考えられる。B社の細胞に関しては、播種2日目まで細胞の剥離に気を付ける必要があるが、どちらの細胞も煩雑な作業を必要とせず、安定して使用できる印象を持った。この点を確認するために、再度実

験を行い、再度、均一な肝実質細胞が得られるか確かめる必要がある。

B社の細胞では、OmeprazoleによるCYP1A1、CYP1A2の発現誘導とRifampicinによるCYP3A4の発現誘導が観察され、また、誘導が確認された遺伝子のうち、CYP1A1とCYP3A4の発現量はヒト肝細胞と遜色が無いくらいに高かった。このことよりB社の細胞は、薬物誘導性評価においてヒト初代培養肝細胞に代わる細胞として期待できる。今後、薬物誘導性評価にB社の細胞を応用するためには、より大きな誘導が観察される条件の検討と再現性の確認が必要である。

C社の細胞では、明確な薬物代謝の誘導は観察できなかったが、基底状態において高い代謝活性が観察された。このことより、培地を含めた培養条件の検討により、明確な薬物代謝の誘導が観察できる条件を見つけることができるかもしれない。今後は、C社の細胞において明確な薬物代謝の誘導が観察できる条件を検討する予定である。

ゲノムDNAのメチル化の結果をhierarchical clusteringすることにより、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG細胞、HepG2細胞を分類することができた。今後はこれらの細胞間におけるクラスターの差異が、どのように薬物代謝能に関与するのかを調べていく予定である。

iPS細胞由来肝細胞を用いた誘導性評価試験のガイドライン案を作成するために、OECDのガイドラインを検討した結果、FDA、EPA、厚生労働省のガイドラインと酵素誘導を評価する指標（OECD：酵素活性、FDA、EPA、厚生労働省：mRNA）に違いがあった。このため酵素誘導の分子機構などを考慮し、どちらの指標が酵素誘導を評価するために適しているかを検討する必要がある。また今後、薬物誘導性評価に用いる

標準物質の選定を更に進める予定である。

qPCR用検量線の検討を行った結果、BioChain社より入手したヒト幹細胞由来RNAのうち、遺伝子発現のばらつきが大きかった3ドナー除いた8ドナーのRNAをプールし検量線の作成に用いることによって、ヒト幹細胞における平均的な発現量を相対発現量1として評価できる系を確立した。

また、入手が遅れているA(ReproCELL)社の細胞に関して、今年度中の入手できる目処がたち、細胞が入手でき次第、実験を行う予定である。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表等

### 論文発表等

- 1) Zeiger E, Gollapudi B, Aardema MJ, Auerbach S, Boverhof D, Custer L, Dedon P, Honma M, Ishida S, Kasinski AL, Kim JH, Manjanatha MG, Marlowe J, Pfuhler S, Pogribny I, Slikker W, Stankowski LF Jr, Tanir JY, Tice R, van Benthem J, White P, Witt KL, Thybaud V.: Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. *Environ Mol Mutagen.*, 2014; doi: 10.1002/em.21923.

### 学会発表等

- 1) 石田誠一：iPS細胞由来肝細胞を用いた薬剤毒性評価技術の最前線、CPhI Japan 2015（国際医薬品原料・中間体展）（2014,4,東京）
- 2) 石田誠一：iPS細胞由来肝細胞の創薬応用

の現状とその有効活用のための周辺技術、  
日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014,5,  
東京)

- 3) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価、動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 (2014,9,札幌)
- 4) 石田誠一：ヒト iPS 細胞由来肝細胞の技術的課題、CBI 学会 2014 年大会 (2014,10,東京)
- 5) Seiichi Ishida, Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Su-Ryang Kim, Yuko Sekino : Evaluation of Human iPS cell-derived Hepatocytes for the Application to ADME/Tox Tests in Drug Development、CBI

学会 2014 年大会 (2014,10,東京)

- 6) 石田誠一：肝臓の代謝酵素誘導評価法の確立、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて (2014,12,東京)

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

B 社

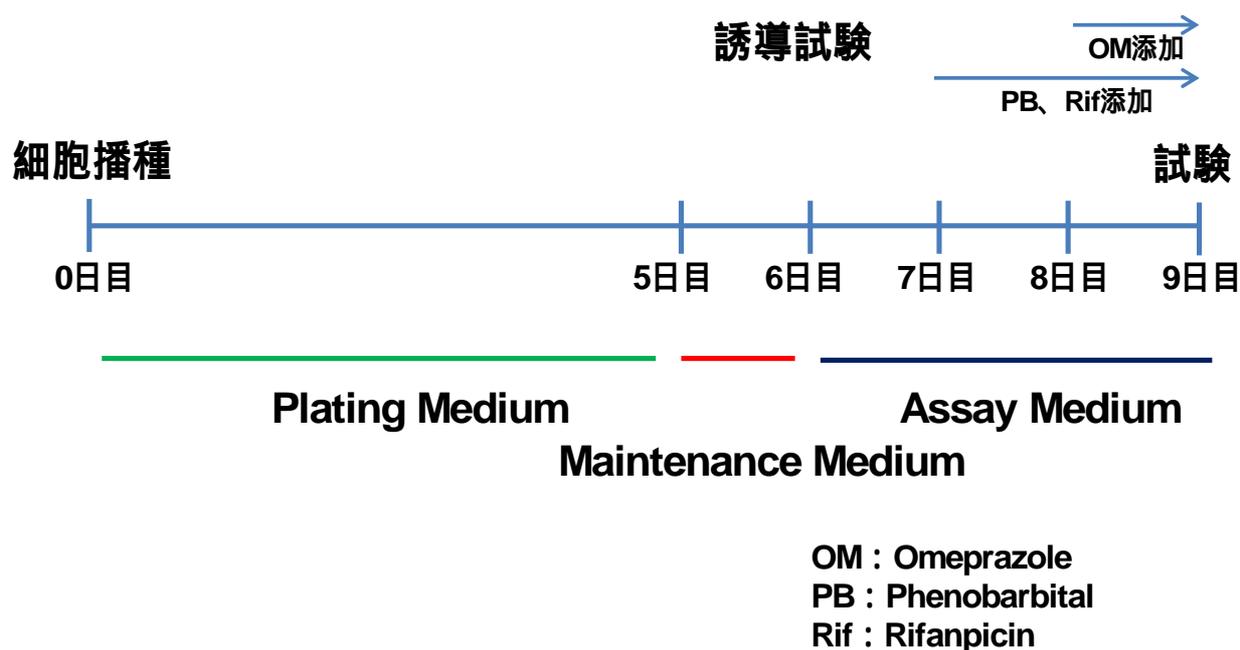
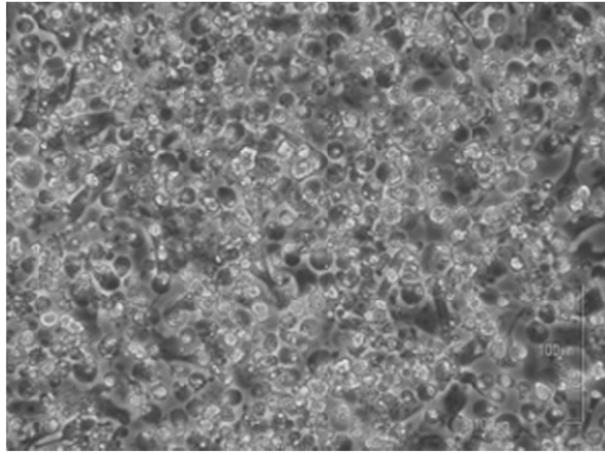


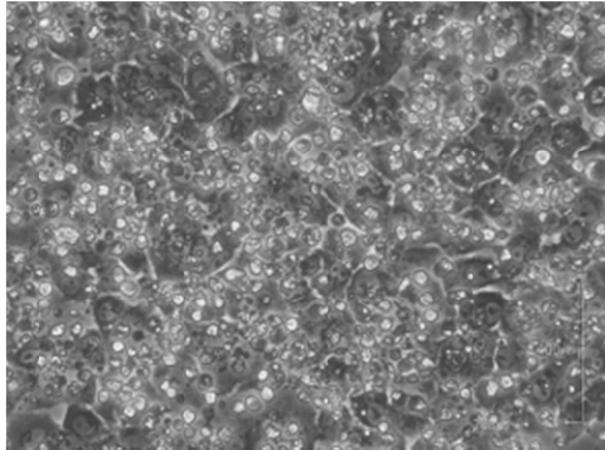
図1 B社の細胞に関する Time Course

9日目に real-timePCR による薬物代謝遺伝子の発現解析、LC-MS/MS による薬物代謝試験に供するサンプルの回収を行った。

**1 日目**



**3 日目**



**9 日目**  
**(試験当日)**

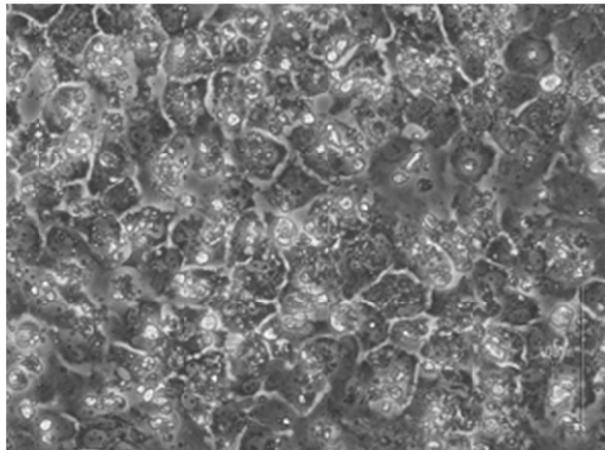
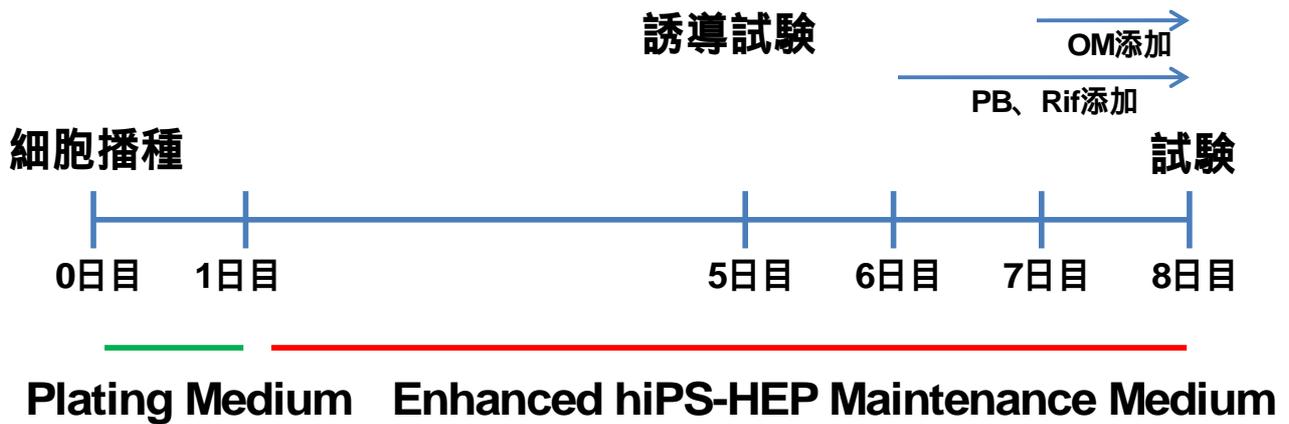


図 2 B 社の細胞の経時変化

- 1 日目：形状が丸く接着が脆弱な細胞が多く存在していた。
- 3 日目：殆どの細胞がプレートに接着した。
- 9 日目：肝実質細胞様の形状を維持していた。

C社

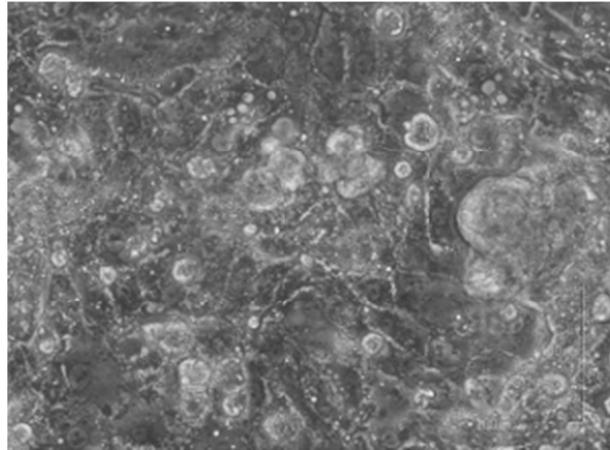


OM : Omeprazole  
PB : Phenobarbital  
Rif : Rifampicin

図3 C社の細胞に関する Time Course

8日目にP450-Gloによるアッセイとreal-timePCRによる薬物代謝遺伝子の発現解析、LC-MS/MSによる薬物代謝試験に供するサンプルの回収を行った。

**1日目**



**8日目  
(試験当日)**

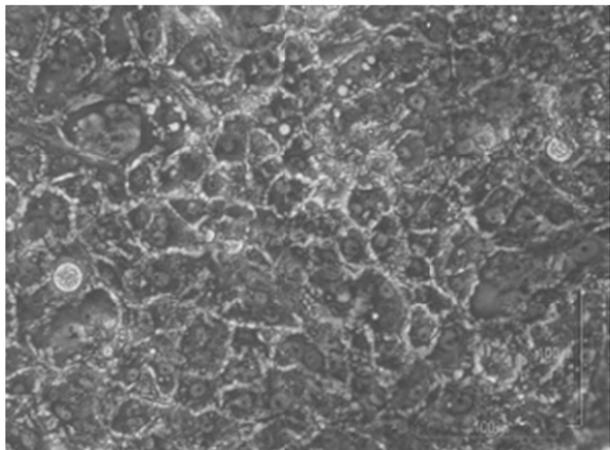


図4 C社の細胞の経時変化

1日目：細胞がプレートに接着していた。

8日目：肝実質細胞様の形状を維持していた。

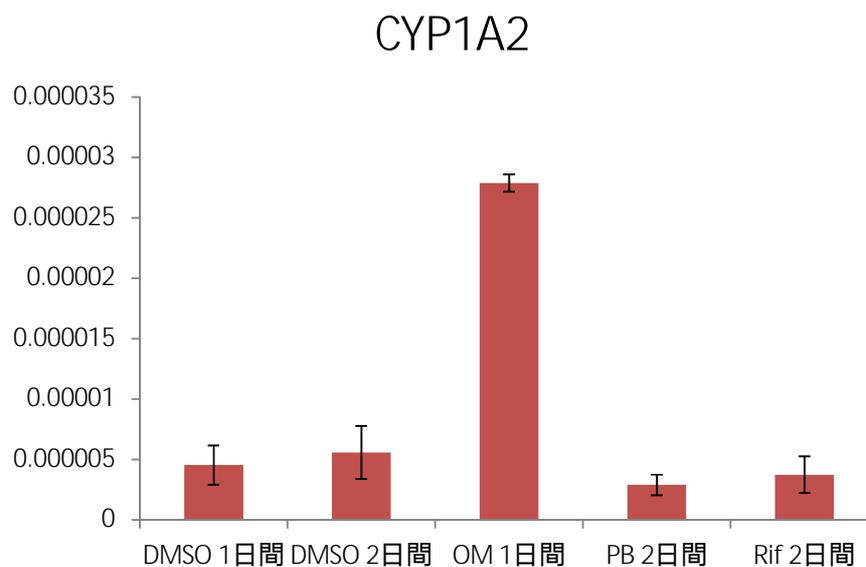
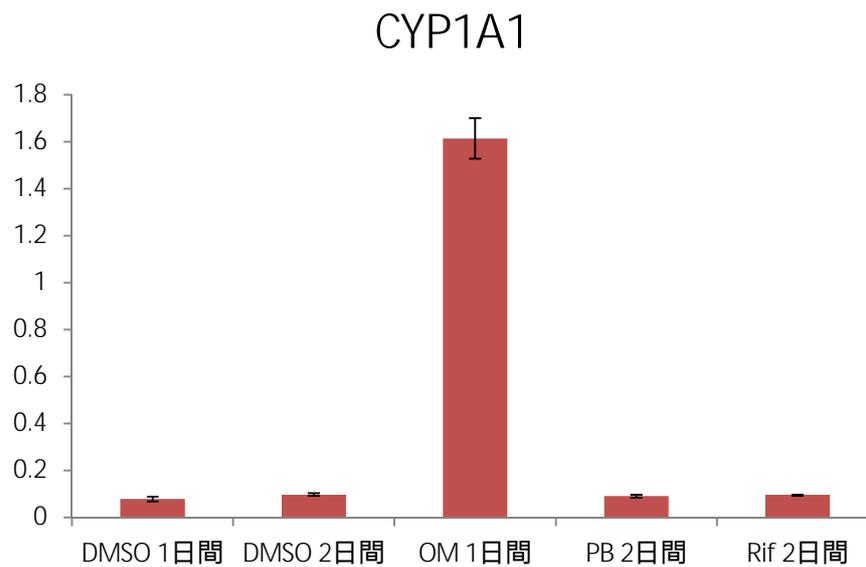


図5 B社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP1A)

播種 9 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

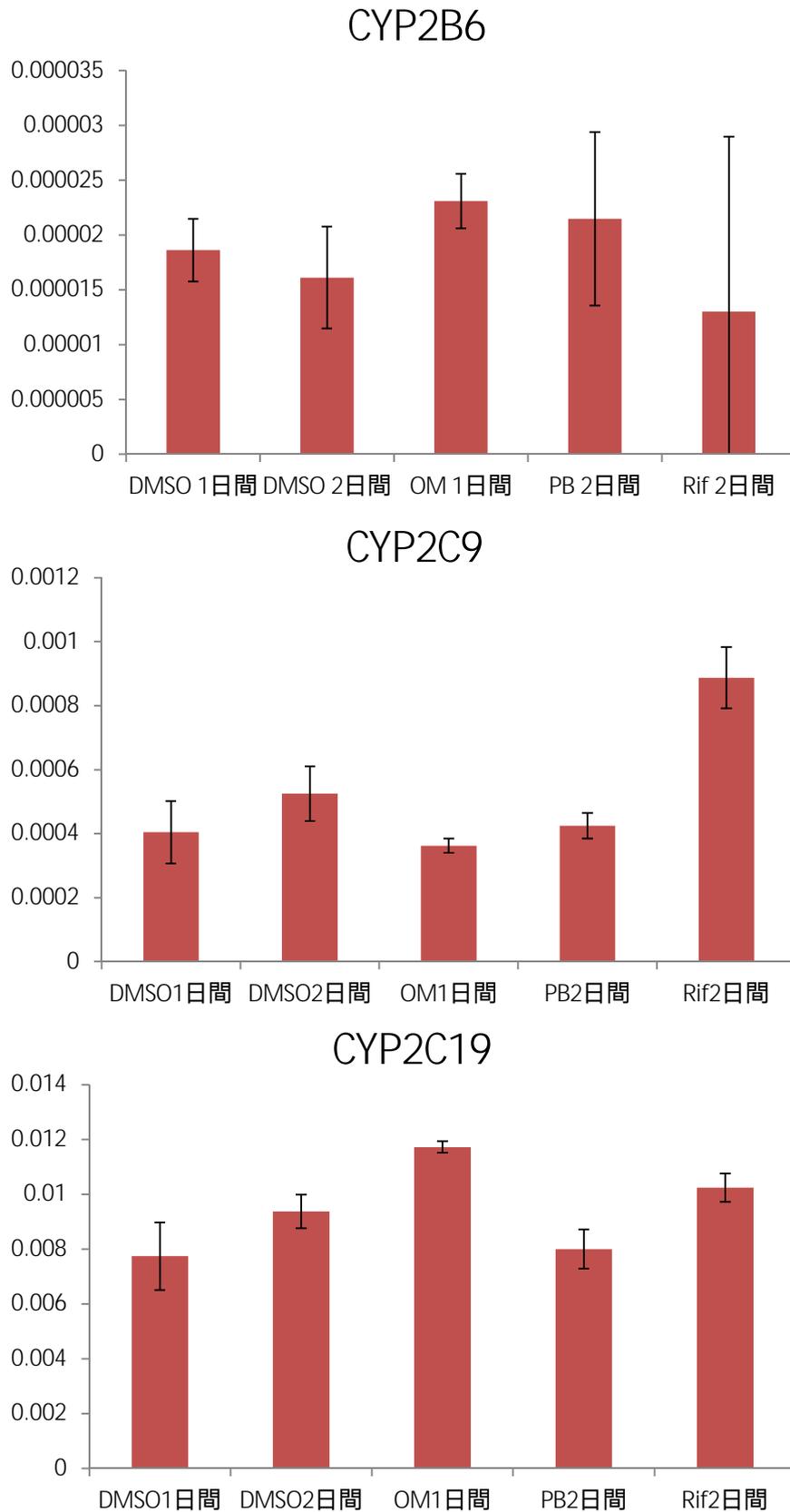


図6 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP2B、2C)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で除することによって規格化した値である。

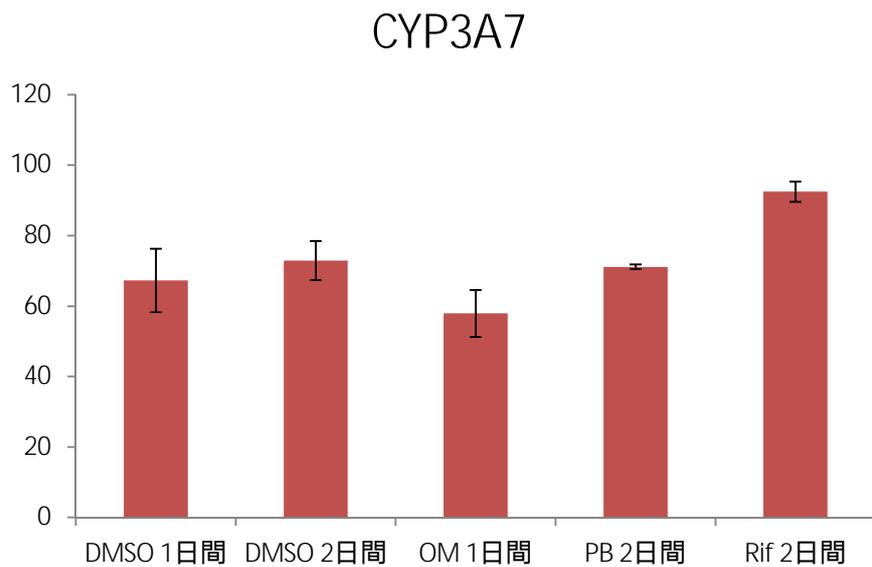
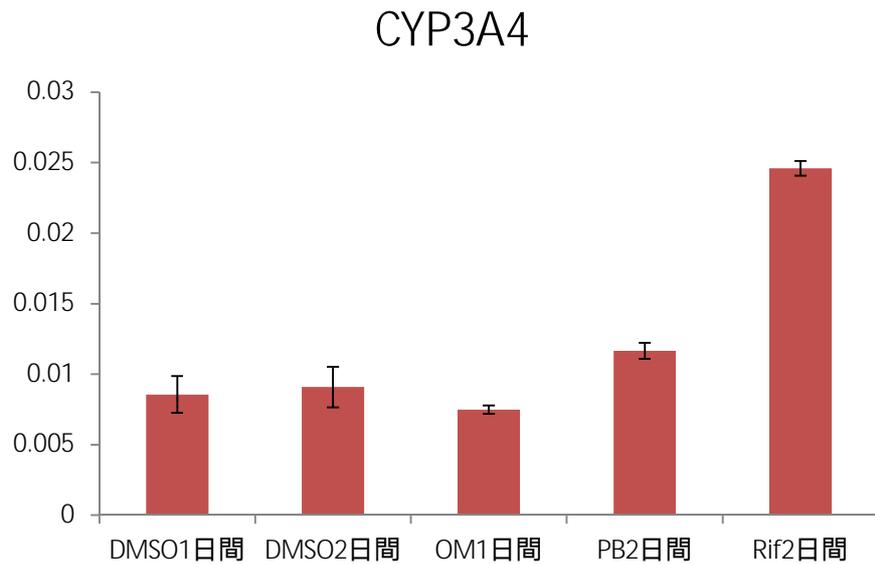


図7 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP3A)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

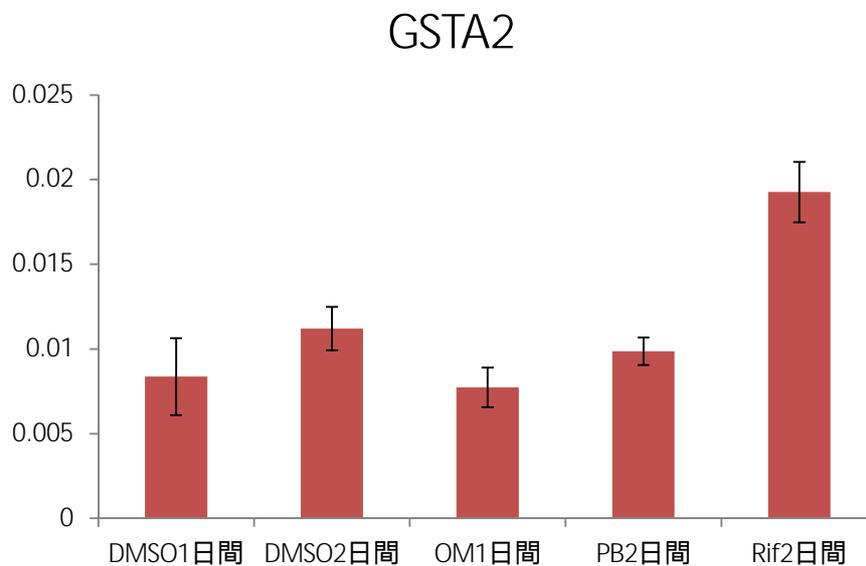


図8 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(第2相酵素)  
播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

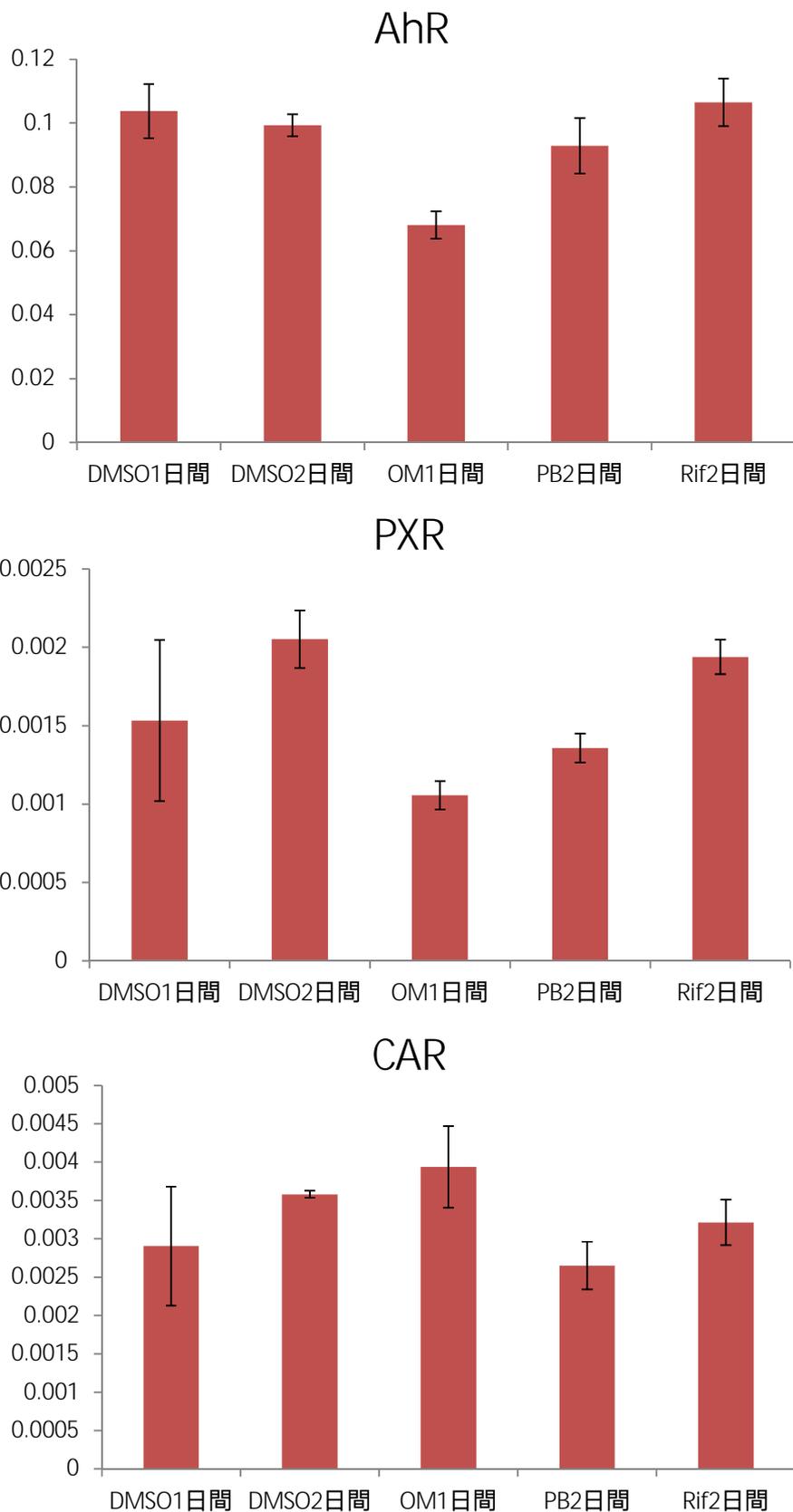


図9 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(核内受容体)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で除することによって規格化した値である。

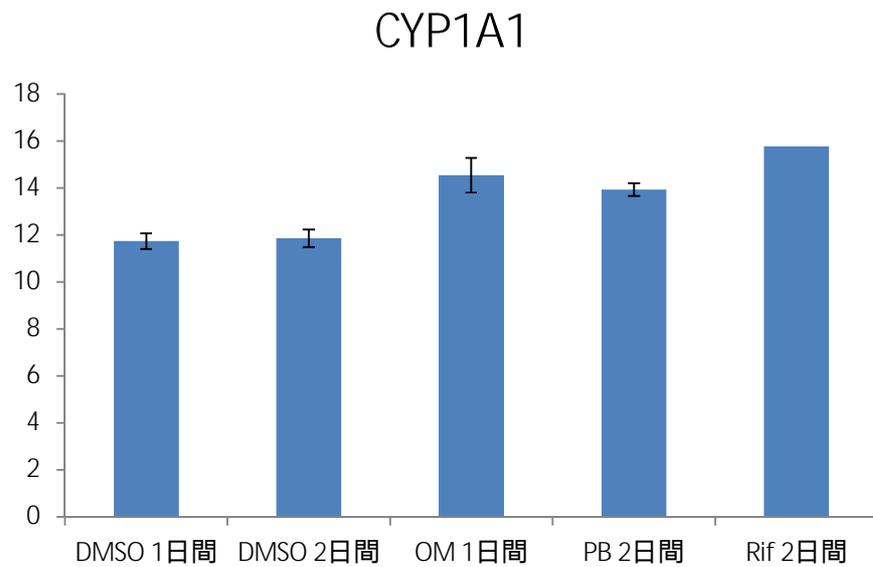
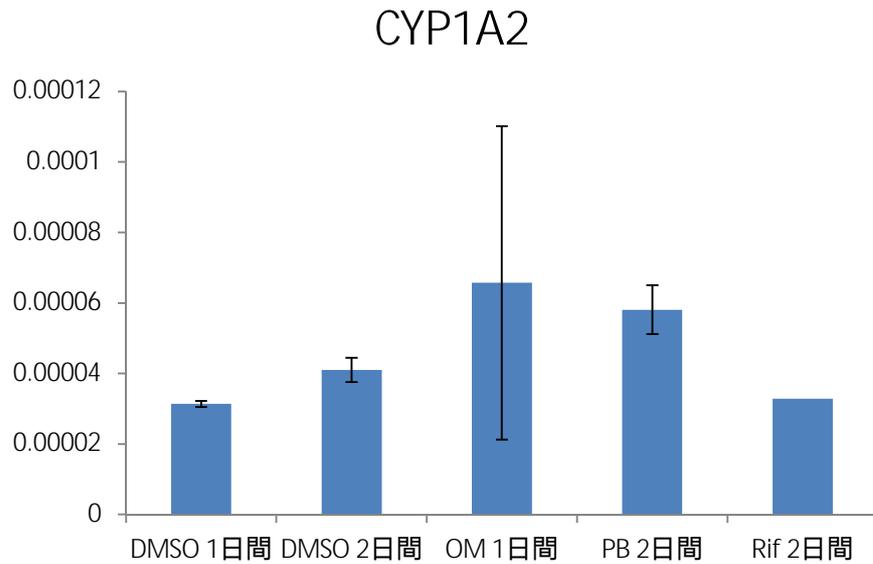


図 10 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP1A)

播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で除することによって規格化した値である。

## CYP2B6

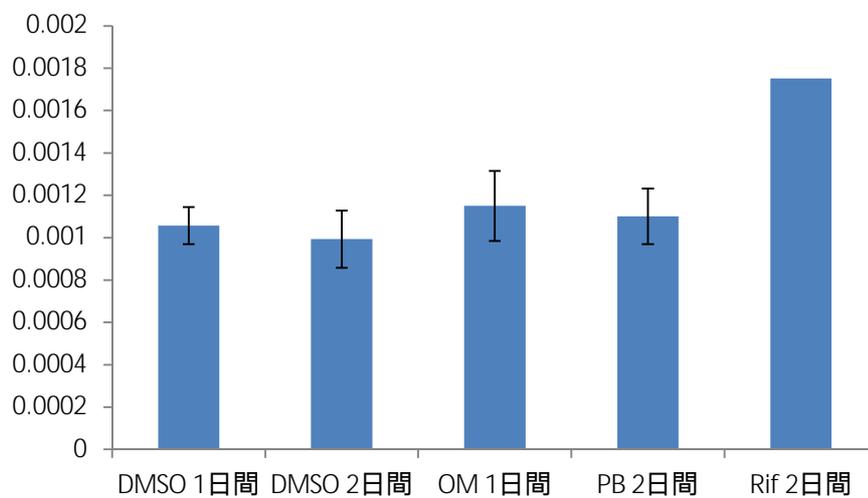


図 11 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP2B)  
播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で除することによって規格化した値である。

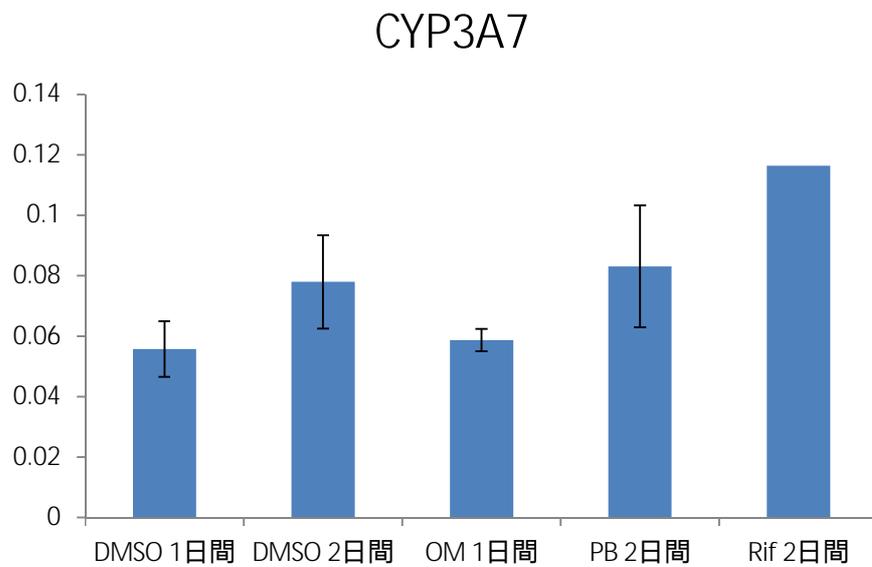
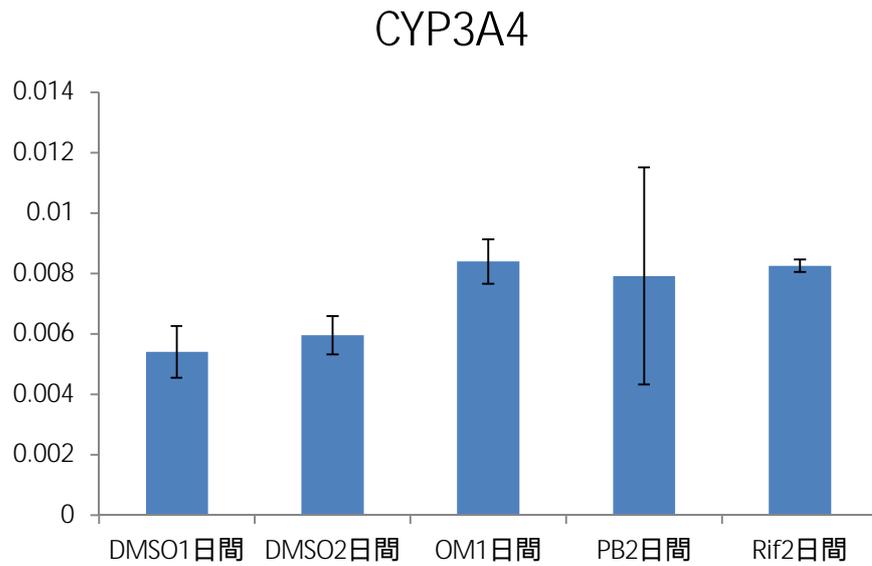


図 12 C社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP3A)  
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

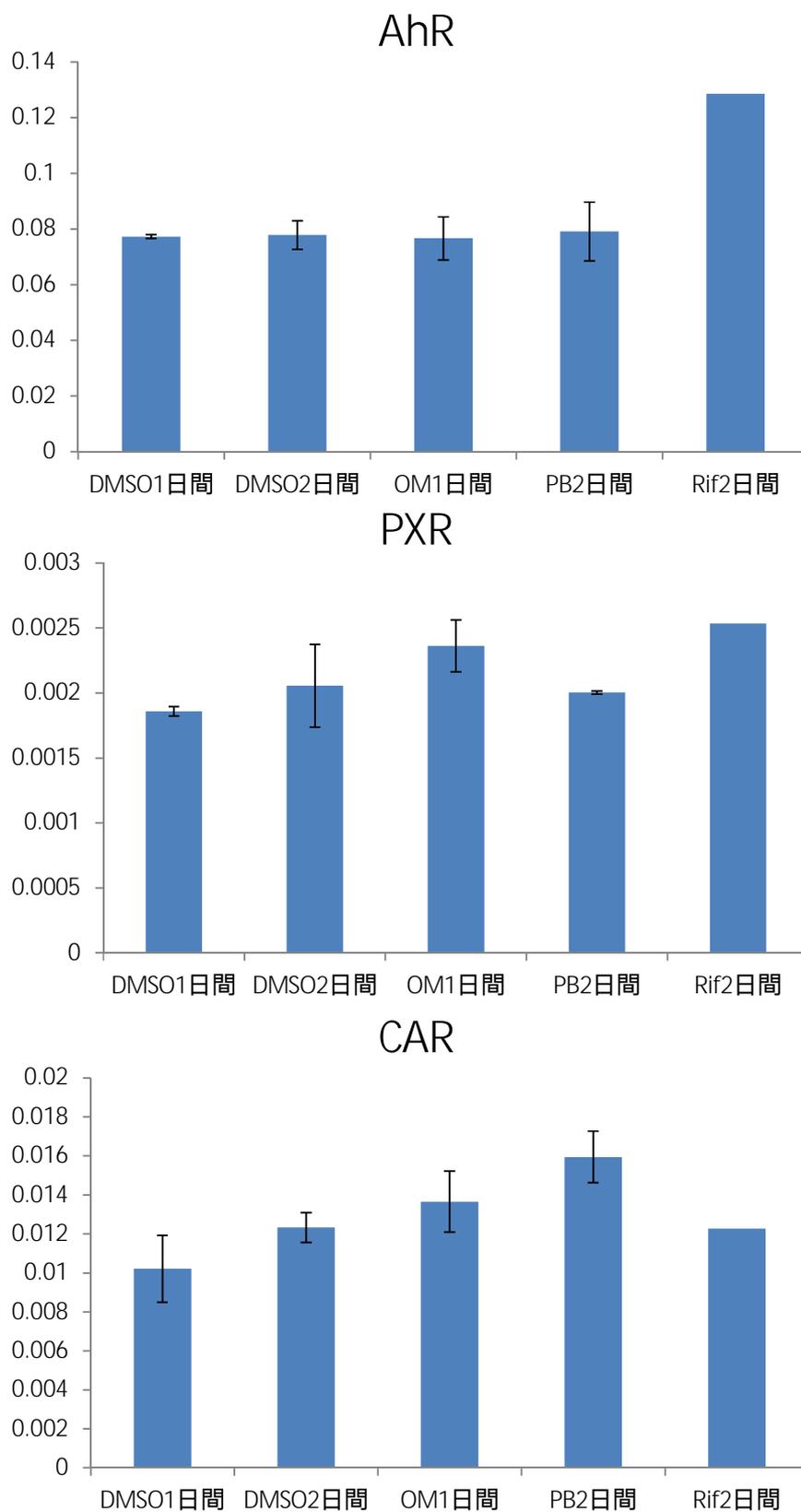


図 13 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析（核内受容体）  
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で除することによって規格化した値である。

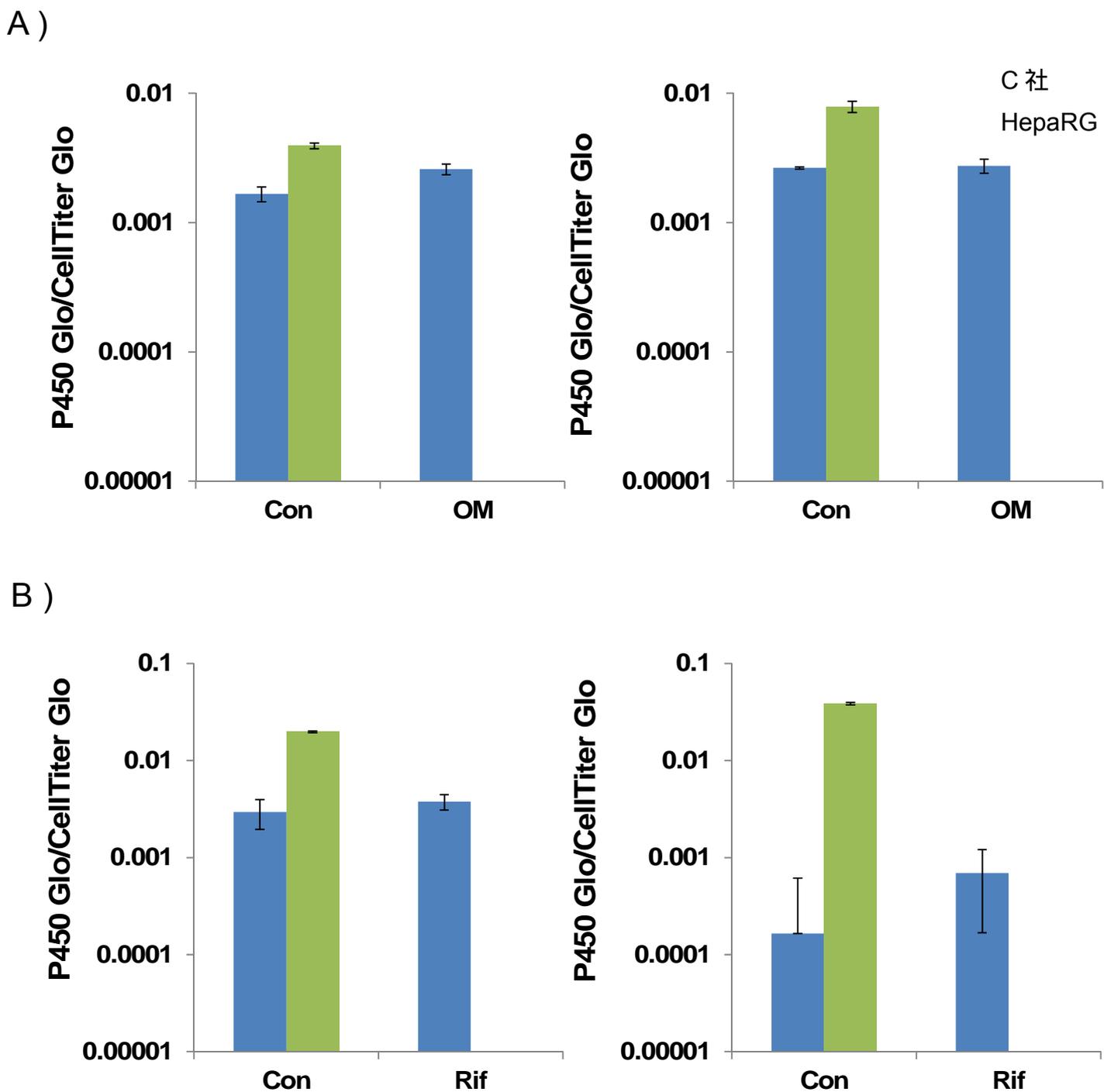


図 14 C 社の細胞における代謝活性

A) CYP1A2      B) CYP3A4

播種 8 日目に P450-Glo により、CYP1A2、CYP3A4 の酵素活性を測定した。縦軸は P450-Glo により測定した酵素活性を CellTiter-Glo により測定した生存活性で徐し規格化した値となっている。左カラムは P450-Glo を 1 時間反応させた結果、2 時間反応させた結果となっている

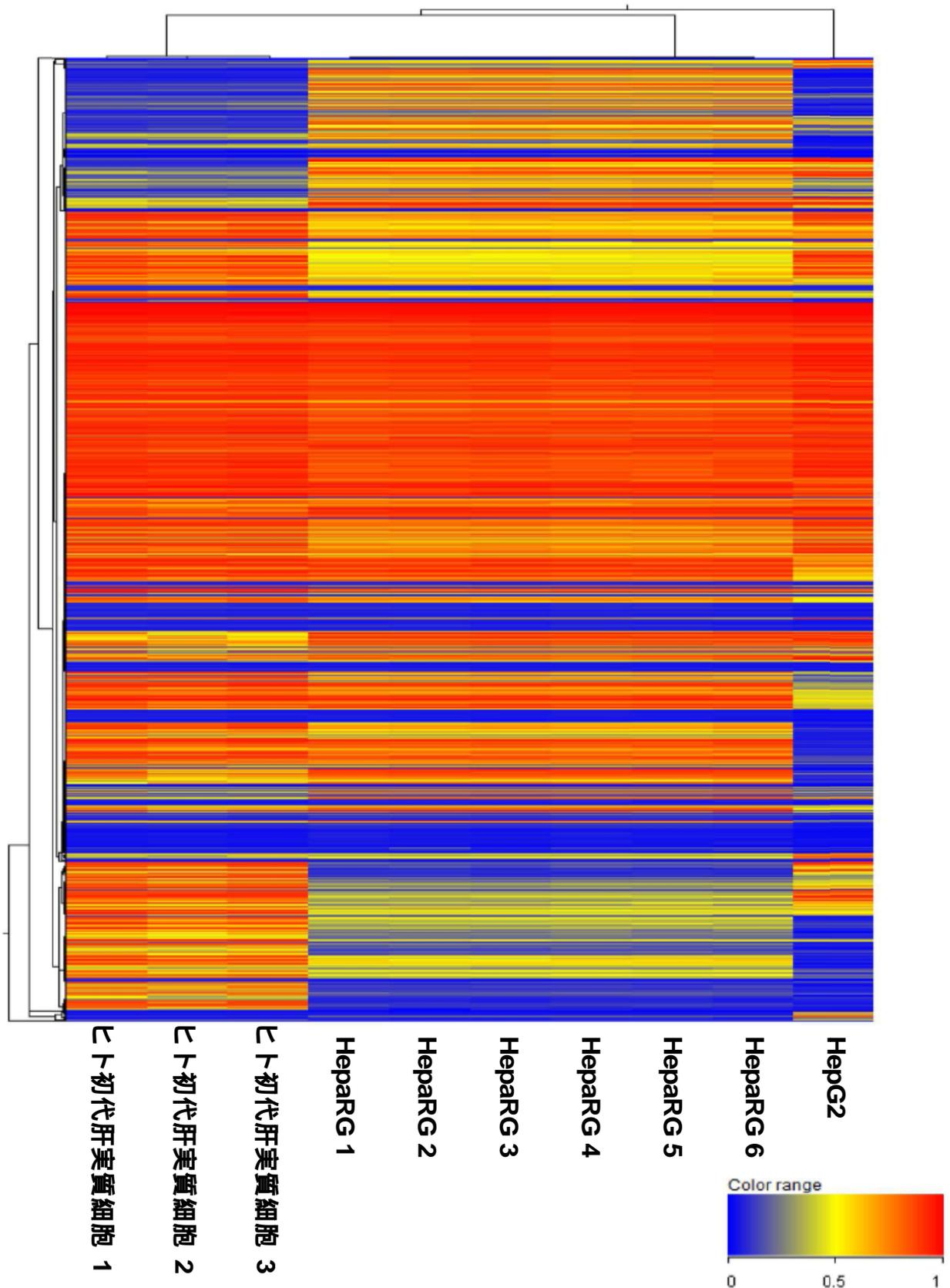
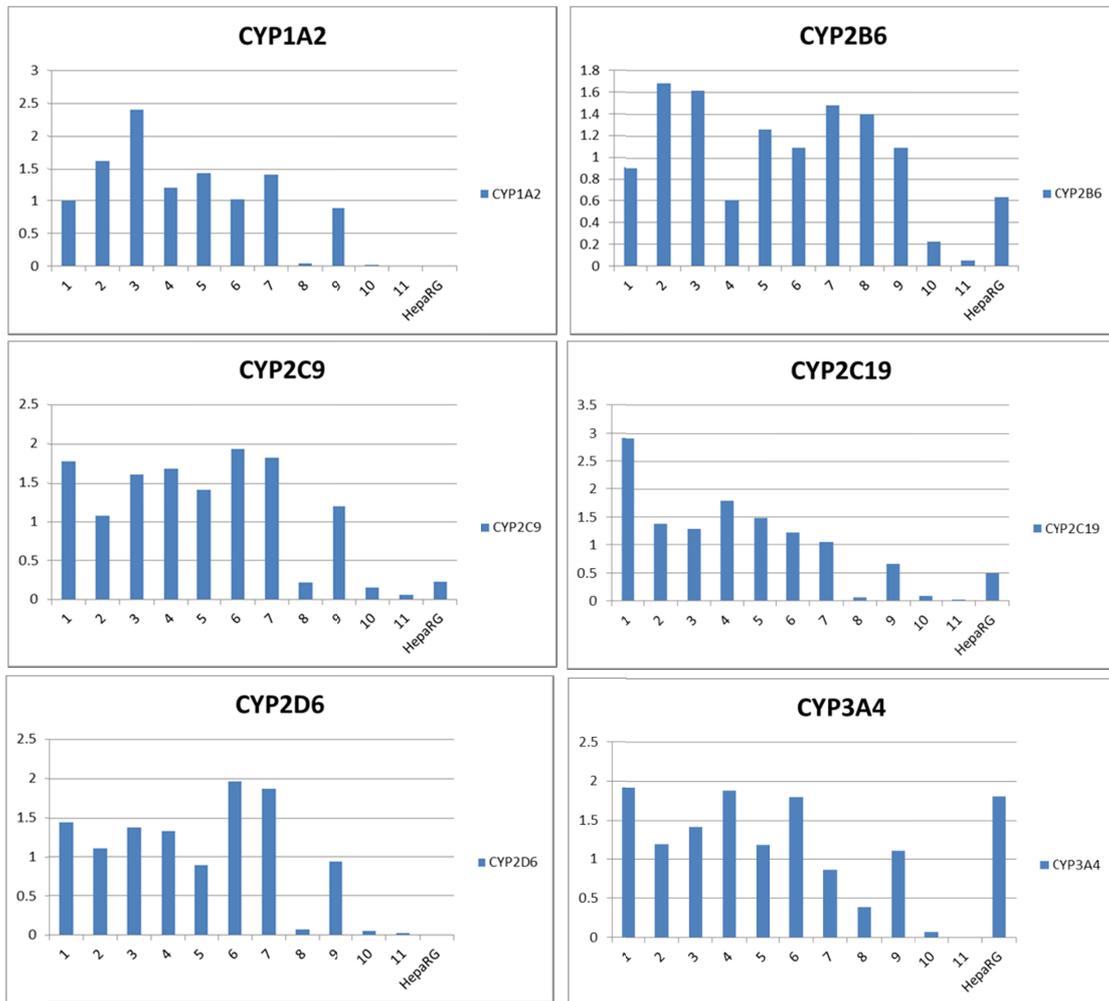


図 15 ゲノム DNA のメチル化解析

ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞におけるメチル化のデータを hierarchical clustering により解析した。ヒートマップの色はメチル化の度合いを示しており、青は「メチル化の度合いが少ない」、赤は「メチル化の度合いが多い」ことを示している。



**BioChain**

**human adult liver RNA**

- 1 : A602084
  - 2 : A610220
  - 3 : A507018
  - 4 : A610219
  - 5 : A605073
  - 6 : A801051
  - 7 : A801128
  - ~~8 : A801129~~
  - 9 : A801130
  - ~~10 : A801136~~
  - ~~11 : A801137~~
- HepaRG

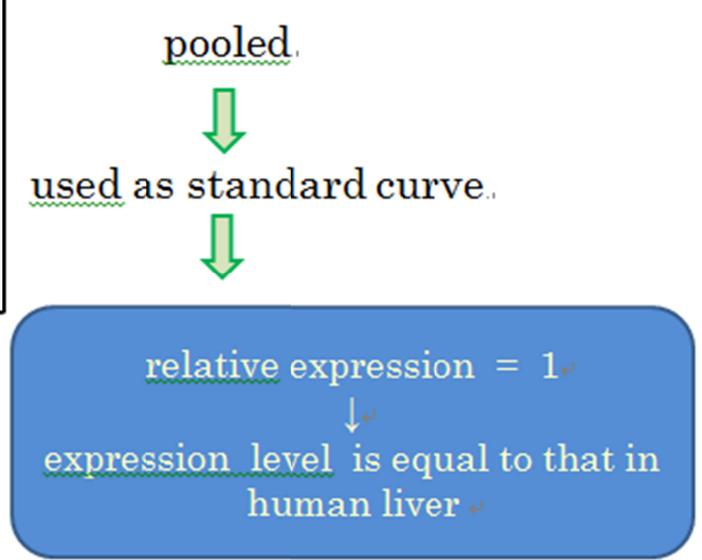


図 16 quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を 11 種類用いて CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 発現を real-timePCR で測定した結果である。発現のばらつきが大きかった 3 ドナーの RNA を除いた RNA をプールして検量線作成に用いることにした。

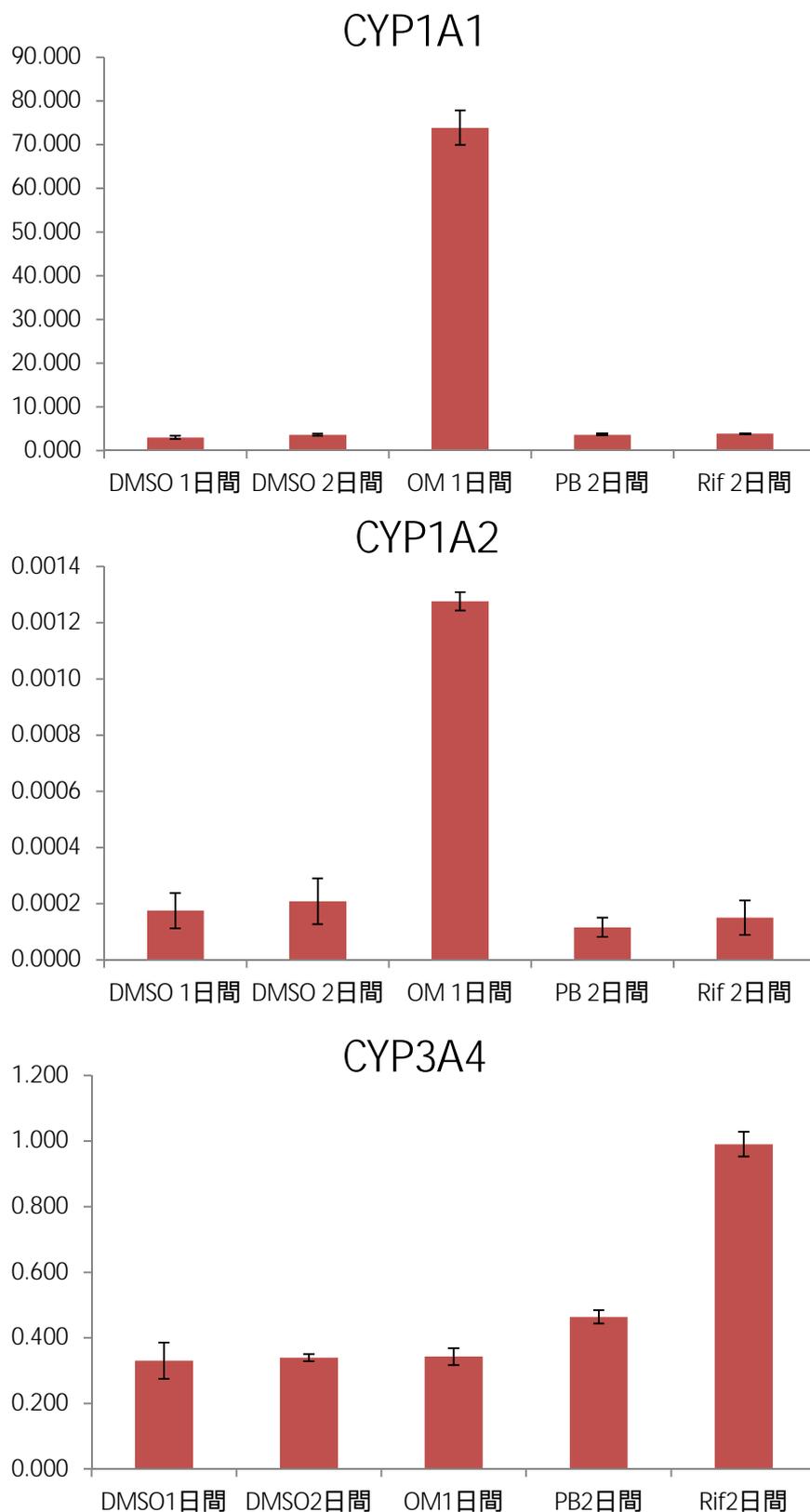


図 17 ヒト肝臓由来 RNA を使用した検量線を用いた発現量評価

播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を使用した検量線より求めた発現値である。

表 1 . B 社 使用培地

<b>iCell Hepatocytes 2.0 Plating Medium<sup>1, 2, 3, 4</sup></b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
RPMI	96	96%
B27	2	2%
Oncostatin M (10 µg/ml)	0.2	20 ng/ml
Dexamethasone (5 mM)	0.002	0.1 µM
Gentamicin	0.05	25 µg/ml
iCell Hepatocytes 2.0 Medium Supplement	2	1X

4°C で 1 週間保存可能。-20°C で保存してはいけない。

<b>iCell Hepatocytes 2.0 Maintenance Medium*</b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
RPMI	96	96%
B27	2	2%
Dexamethasone (5 mM)	0.002	0.1 µM
Gentamicin	0.05	25 µg/ml
iCell Hepatocytes 2.0 Medium Supplement	2	1X

その日に必要な量のMaintenance Mediumを用意する。

4°C で 1 週間保存可能。-20°C で保存してはいけない。

<b>Assay medium</b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
William's medium E ( Phenorl Red 不含 )	200	96%
Dexamethasone (10mM)	0.002	0.1µM
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	8	4%

4 で保存

表 2 . C 社 使用培地

Thawing Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO HT	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632( 室温 ) を終濃度 5  $\mu$ M, で添加する。

Plating Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO CP	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632( 室温 ) を終濃度 5  $\mu$ M, で添加する。

Base Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E	500	99.9%
Penicillin-Streptomycin	0.5	0.1%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

Enhanced hiPS-HEP Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
Base Maintenance medium	49	%
HEP Supplement	1	2%
DMSO	0.25	0.5%

-15 以下で保存 ( 1 ヶ月 ) 凍結融解を繰り返してはいけない

Assay medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E ( Phenol Red 不 含 )	50	96%
Dexamethasone (10mM)	0.007	1.4 $\mu$ M
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	2	4%

4 で保存

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の  
作成

担当責任者 松永民秀 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授

研究要旨

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進もしくは薬物動態学的機能の獲得に有用な低分子化合物を見出した。これを用いて分化させた腸管上皮細胞様細胞は薬物代謝酵素活性を有していた。さらに、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン  $D_3$  により CYP3A4 の mRNA 発現および活性の誘導も認められた。

研究協力者

岩尾岳洋 名古屋市立大学 大学院薬学研究科  
講師

A. 研究目的

小腸には多くの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素が発現しており、これらは医薬品の薬物動態に大きく影響する。したがって、医薬品開発時には医薬品候補化合物の小腸における動態を評価することが極めて重要である。現在、その評価のためには結腸がん由来の Caco-2 細胞が汎用されている。その理由として、Caco-2 細胞は形態学的に小腸に類似しており、薬物の膜透過の評価に適していることが挙げられる。一方で、薬物トランスポーターの発現パターンはヒト正常小腸とは異なることや、薬物代謝酵素の発現量が極めて低いこと、CYP3A4 の発現に関わる核内受容体である PXR の発現が認められないことが報告されている。したがって、Caco-2 細胞では小腸における薬物の膜透過と代謝をあわせて評価することや、P-gp や

CYP3A4 の誘導の評価には適さないことが問題となっている。

ヒト iPS 細胞が樹立されて以来、再生医療だけでなく創薬への応用に向けた研究も多く行われている。ヒト iPS 細胞から組織細胞への分化誘導に関する報告のうち、薬物動態を制御する主要な臓器である肝臓へ（肝細胞）への分化誘導の報告は多く存在するものの、腸管への分化誘導に関する報告は極めて少ない。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から成熟腸管上皮細胞を作製し、誘導性の評価が可能なモデル系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センター研究所において樹立されたヒト iPS 細胞株 (Windy) を用いた。ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化細胞の割合が約 70% になった状態で開始した。

まず、アクチビン A 含む培地で内胚葉へ分化

させ、さらに線維芽細胞増殖因子2を含む培地で腸管幹細胞へ分化させた。その後、Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 を 10  $\mu$ M となるよう添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C で 60 分間処理した後、細胞をアクターゼで剥離し、あらかじめ希釈した GFR マトリゲルでコーティングした細胞培養用 24 ウェルプレートに播種した (Y-27632 は播種後 24 時間培地に添加した)。細胞播種後、上皮成長因子を含む培地で腸管上皮細胞へ分化させた。低分子化合物は上記のある期間に添加した。

薬物代謝酵素誘導実験では、1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> を細胞回収前に 48 時間処理した。

ペプチドの取り込み実験では、 $\beta$ -Ala-Lys-AMCA(蛍光ラベルされたジペプチド) を 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C でインキュベートした後、細胞内取り込みを顕微鏡下で観察した。

#### <倫理面への配慮>

本研究では国立成育医療研究センター研究所において樹立されたヒト iPS 細胞を用いており、倫理面の配慮は特に必要ないと判断される。

### C. 研究結果

我々が以前報告したヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法 (Iwao *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, **29**, 44, 2014) に基づき、分化誘導時にさまざまな液性因子および低分子化合物を用いて成熟化に効果的な因子のスクリーニングを行った。その結果、ある低分子化合物を用いることで腸管上皮細胞マーカーであるスクラーゼ-イソマルターゼや主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現の上昇が認められた

(Fig. 1)。また、この腸管上皮細胞様細胞は重要な排出トランスポーターである P-gp や BCRP の発現や、各種薬物代謝酵素活性 (CYP1A1/2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5, UGT, SULT)、ペプチドトランスポーターを介したペプチドの取り込み能も認められた。さらに、1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> を処理することで、CYP3A4 の mRNA 発現および活性の誘導も認められた (Fig. 2)。

### D. 考察

今回我々が見出した低分子化合物を用いて分化誘導させた細胞は、スクラーゼ-イソマルターゼをはじめとした腸管上皮細胞マーカーや P-gp, BCRP などの薬物トランスポーター、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 を発現していた。また、形態学的にも敷石状で腸管上皮細胞に類似した形態を示していたことから、この分化させた細胞は腸管上皮細胞様細胞であることが示唆された。さらに、薬物代謝酵素活性やペプチドの取り込み能に加え、1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> による誘導能も認められたことから、腸管上皮細胞に特異的な薬物動態学的機能を有する細胞であることも明らかとなった。以上のことから、我々がヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞様細胞は薬物の吸収や代謝だけでなく、誘導性評価のためのモデル細胞としての有用性が示された。

### E. 結論

今回我々は、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進もしくは薬物動態学的機能の獲得に有用な低分子化合物を見出した。この化合物を用いて分化させた腸管上皮細胞様細胞は薬物代謝能やペプチドの取り込み能だけでなく、CYP3A4 の誘導能も有していたことから、

腸管における誘導性評価のモデル細胞としての利用の可能性が示された。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, **Matsunaga T**: Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos*, 2014; **42**: 1947–1954.
- 2) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, **Matsunaga T**: Histone deacetylase inhibitors promote hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*, 2014; **9**: e104010.
- 3) Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, **Matsunaga T**: Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 407–413.
- 4) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, **Matsunaga T**, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells

retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 237–243.

- 5) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, **Matsunaga T**: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 44–51.
- 6) **松永民秀**, 岩尾岳洋: 多能性幹細胞 (ES細胞, iPS細胞) の利用. 薬剤学実験法 必携マニュアル—Pharmaceutical Scientistのために— II 生物薬剤学, 日本薬学会出版委員会編, 南江堂, 東京, 2014年; p. 299–311.

##### 学会発表等

- 1) **Matsunaga T**, Utility of iPS cells for drug metabolizing enzyme expression. 29th JSSX Meeting - 19th North American ISSX joint meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 2) 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, **松永民秀**: ヒト iPS 細胞由来小腸幹細胞の至適培養法の開発. 第 66 回日本生物工学会大会 (2014. 9, 札幌).

##### 報道発表等

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) **松永民秀**, 岩尾岳洋「人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法」国際出願番号: PCT/JP2014/054379, 国際出願日: 2014年2月24日.

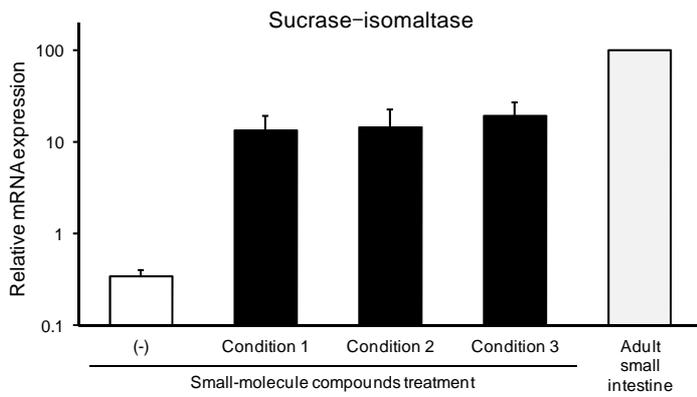


Fig. 1. 腸管上皮細胞様細胞におけるスクラーゼ-イソマルターゼの mRNA 発現

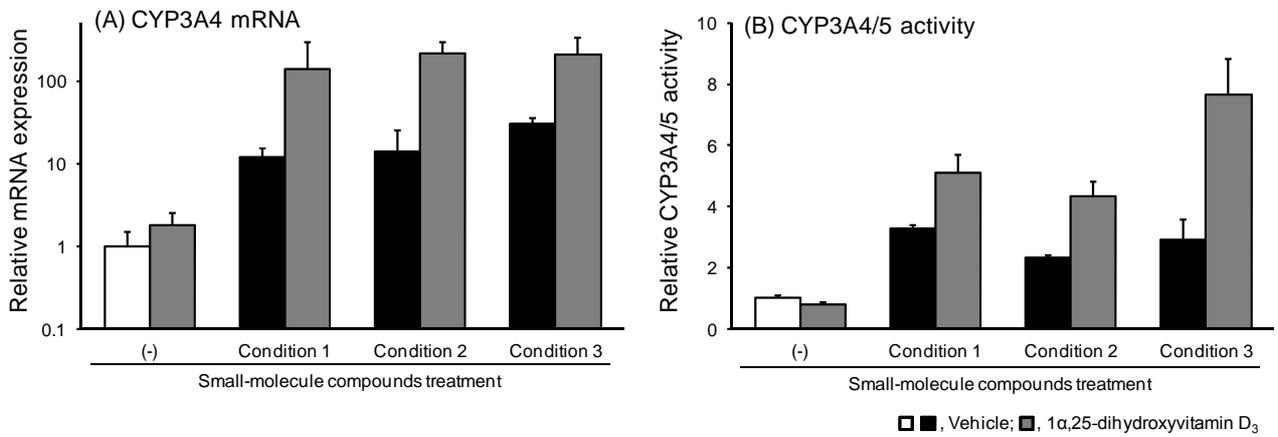


Fig. 2. 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> による CYP3A4 mRNA 発現と CYP3A4/5 活性の誘導

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・  
品質基準の作成

担当責任者 条 昭苑 東京工業大学 生命理工学研究科 教授

研究要旨

今回はヒト-iPS細胞からヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行ない、分化促進化合物、よい培養条件が得られた。分化途中細胞の表面抗原の解析結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃縮・純化できる方法を新規に見出した。代謝酵素などの成熟マーカーの発現も確認された。今後、今回見出した化合物を利用する分化誘導方法と純化方法を組み合わせて、さらに後の成熟化の培養条件をより適した方法の検討を加えることにより、より高効率、高成熟度の小腸上皮細胞が得られると期待される。

研究協力者

白木伸明 熊本大学 発生医学研究所 准教授  
坂野大介 熊本大学 発生医学研究所 助教  
山添大士 熊本大学 発生医学研究所 研究員  
大垣総一郎 熊本大学医学教育部博士課程1年

縮・純化できる方法を開発することより、今後の分化効率化へ向けての展開を図った。

<倫理面への配慮>

今回の研究は細胞株由来のヒト iPS 細胞を使用し、患者由来のものではないため、倫理面への配慮が特に問題にはならない。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行なった。分化誘導を促進する化合物、培養条件について検討を行なった。さらに、その条件下でヒト iPS 細胞から得られた途中段階の分化細胞について解析を行い、分化の経路を検証した。さらに、表面抗原の解析結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃

C. 研究結果

C1. ヒト iPS 細胞からの腸への分化誘導方法の最適化を検討したところ、ある化合物を加えることにより、分化誘導の日数の短縮が認められ、腸への分化誘導効率が有意に上昇した。さらに、この化合物を用いて分化誘導した小腸上皮細胞は薬物代謝酵素 Cyp3A4 を発現する細胞に分化することを確認した。

一方、分化の途中段階の細胞について解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞マーカーとしては CDX2 が指標とされるが、CDX2+

細胞には SOX17+と SOX17-細胞が存在し、その中でも CDX2+SOX17+細胞が CYP3A4 や MDR1 などを発現する小腸上皮細胞へ分化することを見出した。また CDX2+SOX17-に関しては胎盤の細胞へ分化することを見出した。したがって、これらの結果から、CDX2 というマーカー単独だけでは、真の小腸上皮とは言えないことが明らかになった。CDX2 と同時に SOX17 を評価に使用し、CDX2+SOX17+細胞を指標として評価すれば、真の小腸上皮細胞であるといえる。

さらに、簡易的濃縮方法の検討を行った。様々な細胞外マトリクスの上に継代し、分化細胞の接着効率、濃縮度について検討を行なった。

その結果、ある細胞外マトリクスを用いることにより CDX2+SOX17+細胞を特異的に濃縮することが可能であることを新規に見出した。なお、この細胞外マトリクスの受容体がマウス胚で特異的に小腸上皮に発現していることを見出し、生理的に意味がある現象であることが裏付けられた。また、今回の方法により分化誘導して得られた小腸上皮細胞から、Cyp3A4 陽性の細胞が得られ、このことから、分化誘導方法が適切であることを裏付けられた。

なお、今年度はトランスウエルでの培養方法も試したが、引き続き、次年度さらに検討する予定である。

#### D. 考察

これまでの分化の指標では胎盤細胞への分化も同時に観察しており、新たなマーカーを指標にすることでより特異的に小腸上皮細胞への分化誘導を行える。また CDX2+SOX17+細胞の濃縮を簡便に行えることから今後の分化誘導をより効率的に行える。またあるインテグリンが小腸上皮細胞特異的に発現しており、分化メカニズムの解析も今後大きく進展すると期待さ

れる。

#### E. 結論

今回の研究の結果により、真の小腸上皮細胞のマーカーを同定し、それを利用して、分化誘導して得られた小腸上皮細胞の簡易的濃縮方法の確立を行った。また、分化を促進する化合物を得て、これを利用して分化の加速化、高効率化に成功した。今後はこれらの成果をさらに応用して、分化成熟度の高い小腸上皮細胞の作成へ向けて展開出来ると期待される。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation”, *Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series)* (Edited by Kursad Turksen), *in press*
- 2) Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in “iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation –Methods and Protocols” *Methods Mol Biol.* 2014 [Epub ahead of print]
- 3) Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, *Methods Mol Biol.* 2014 Nov 20. Epub. in “ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition” [Epub ahead of print]
- 4) Shiraki N, Ogaki S, Kume S\*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud.* 11(1):102-14, 2014.

- 5) Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 394-408, 2014.
- 6) Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S\*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. **Cell Metab.** 19, 780-794, 2014.
- 7) 白木伸明 桑昭苑 「ES/iP 細胞を用いた内胚葉細胞（膵、肝、小腸）への分化誘導」『iPS 細胞研究最前線－疾患モデルから臓器再生まで』 医学のあゆみ」251, 1153-1159, 2014 . (長船健二 編集)
- 8) 坂野大介 桑昭苑 「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 器官の発生と再生の基礎』 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団(医学書院) 生体の科学 65. 197-202, 2014. 6月
- 9) 白木伸明 桑昭苑 「メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している」First Author's <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>

#### 学会発表等

- 1) 白木伸明 「ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝臓を分化誘導する方法の開発」第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム 『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会 (H26. 12. 9. 東京)
- 2) 白木伸明 『幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み』ワークショップ(原孝彦・桑昭苑オーガナイザー) 第 37 回日本分子生物学学会 (H.26. 11. 26 横浜)
- 3) 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、桑 和彦、遠藤 文夫、桑 昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第 37 回日本分子生物学学会 (H.26. 11. 26 横浜)
- 4) Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S. “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 5) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/iPS cells” Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 6) Otera K, Ogaki S, Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 7) 桑昭苑 「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日 (東京)
- 8) Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
- 9) Kume S “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13,2014)
- 10) Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. 第 12 回幹細胞シンポ

ジウム 福岡 (12<sup>th</sup> SCRS-Fukuoka) May 30-31,  
2014.

#### 報道発表等

- 1) TOP STORY として論文の紹介 ESC & iPSC  
News 9.25 July 2, 2014 Web ニュース  
<http://s1832.t.en25.com/e/es.aspx?s=1832&e=123108&elq=ceb3aa38f4034b5d8ab46b1081cf4f3f>
- 2) 科学新聞「ヒト iPS / ES 細胞 メチオニン除去培養液で効率的に分化」2014. 4.25
- 3) 熊本日日新聞「ヒト iPS、ES 細胞効率分化 熊本大研究所グループ メチオニン除去培養液を使用」2014. 4.23.
- 4) 朝日新聞(熊本版)(生活面)『熊本大・白木助教と糸教授 アミノ酸組成着目「簡便な方法」発見』2014. 4.19.
- 5) 朝日新聞全国版「万能細胞培養の効率アップ 熊本大などのチームが発見」2014. 4.18.
- 6) 日経産業新聞「iPS・ES 細胞分化防ぐ ヒトのアミノ酸発見 熊本大・東大」2014. 4.18.
- 7) 読売新聞熊本版「iPS 分化、効率的に 熊大研究者ら成功 アミノ酸の働きで」2014. 4.18.
- 8) NHK ニュース 2014. 4.18. 6時 55 分
- 9) KKT テレビタミン 2014. 4.18.18時 20分
- 10) RKK 夕方いちばん 2014. 4.18. 18時 19分

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 糸 昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木恭子、糸 和彦、馬渡一徳「アミノ酸組成変更培地を用いた幹細胞の分化促進方法、及び該方法を用いて処理された幹細胞、並びに培地」特願 2014-32068 出願日：2014 年 9 月 10 日

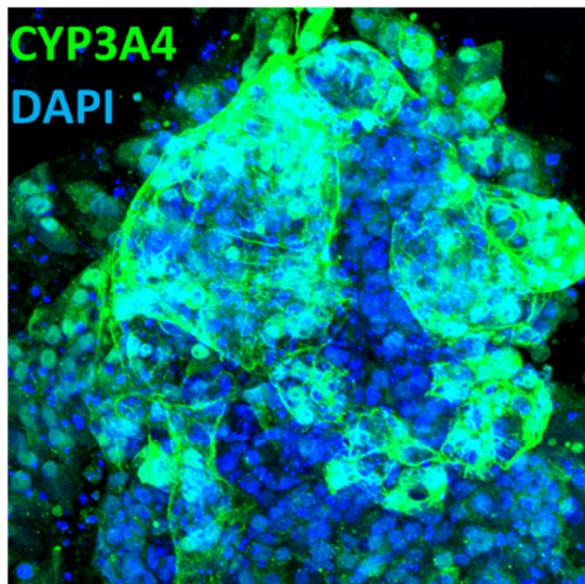


図 分化小腸上皮細胞から、薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現を確認した。  
今後は機能についても確認予定である。

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

担当責任者 水口裕之 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

小腸上皮細胞は、様々な薬物トランスポーターや薬物代謝酵素を発現しており、薬物の吸収・代謝において重要な役割を担う。薬物の吸収過程を評価するためにヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞が汎用されているが、Caco-2 細胞はいくつかの問題点を抱えている。まず、Caco-2 細胞はヒト小腸上皮細胞と比べ、薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP)3A4 の発現量が著しく低いいため、小腸上皮細胞における薬物の吸収・代謝を同時に評価することが困難である。そこで我々は、ほぼ無限の増殖能と小腸上皮細胞を含むあらゆる体細胞への分化能を有するヒト ES/iPS 細胞からヒト小腸上皮細胞に類似した薬物吸収・代謝機能を有する細胞を作製する技術の開発を試みた。ヒト ES/iPS 細胞から小腸前駆細胞を分化誘導したのち、化合物 A、B、C を作用させるとともに、分化誘導期間を延長することによって、小腸上皮細胞への分化誘導効率が約 20%から約 40%に上昇した。このようにして作製したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CYP3A4 遺伝子発現量は Caco-2 細胞よりも高かった。また、CYP3A4 誘導能を有していることも確認した。以上の結果より、我々の分化誘導法を用いることによって、Caco-2 細胞よりもヒト小腸に近い薬物代謝酵素発現を有する小腸上皮細胞をヒト ES/iPS 細胞から効率良く作製できることが示された。したがって、本研究により得られたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を *in vitro* 薬物吸収・代謝評価系へ応用することで、既存の評価系の抱える問題点を克服できる可能性が示唆された。

研究協力者

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科 学生  
小澤辰哉 大阪大学大学院薬学研究科 学生

A. 研究目的

小腸は吸収上皮細胞、分泌系細胞、幹細胞などの細胞から構成されており、この中でも吸収上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与され

た薬物の吸収や代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収を評価するための *in vitro* 評価系としては、ヒト小腸吸収上皮細胞の入手は困難であるため、ラット等の小動物由来小腸組織を用いた反転腸管法やヒト大腸癌細胞株 Caco-2 細胞を用いた系が汎用されている。しかしながら、前者は動物由来組織を用いているため種差の問題があり、後者は Caco-2 細胞がヒト小腸

吸収上皮細胞に比べ、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量が著しく低いという問題点を有している。小腸吸収上皮細胞は、シトクロム P450 3A4 (CPY450) 等の薬物代謝酵素を発現し、薬物の吸収だけでなく代謝も行うが、Caco-2 細胞は薬物代謝酵素の活性が極めて低く(ほとんど発現しておらず) “代謝と吸収” を同時に評価できないという決定的な欠点を有する。

以上のような背景のもと、我々は、増殖能力に優れ、多分化能を有するヒト iPS 細胞から小腸吸収上皮細胞を分化誘導することで、この問題点を解決できると考え、この分化誘導法の開発を試みている。ヒト ES/iPS 細胞から小腸組織への分化誘導研究は極めて遅れており、Spence らが 2011 年に Nature 誌に発表した報告が最初である (Nature. 470.105-9. 2011)。しかしながら、本報告では、再生医療を目的とした研究であるためヒト小腸吸収上皮細胞の作製ではなく、小腸組織の作製に主眼が置かれているため、吸収上皮細胞への選択的な分化誘導については未検討である。我々は、これら既存プロトコールを参考に、改良を加えながら、ヒト iPS 細胞から薬物吸収・薬物代謝・薬物誘導試験などに応用可能な小腸吸収上皮細胞への分化誘導法の開発を試みた。本研究では、これらの基本プロトコールをさらに改良して小腸吸収上皮細胞への高効率分化誘導法を開発するとともに、Caco-2 細胞に取って代わる、薬物誘導能および薬物の “代謝能と吸収能” を同時に評価可能な *in vitro* 評価系の開発を目指す。

## B. 研究方法

### B.1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 Tic は、10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学

工業) を含む ReproStem (ReproCELL) 培地でマイトマイシン C 処理した MEF (Millipore) 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 3-5 日ごとに 0.1 mg/ml の Dispase (Roche) を用いて、コロニーのまま継代を行った。

### B.2. ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞株 Tic を Dispase で剥離し、回収した細胞を Matrigel (BD Biosciences) をコーティングした細胞培養用マルチプレート(住友ベークライト) の各ウェルにコロニーのまま播種した。その後、100 ng/ml Activin A (R&D systems) および 0.2-0.5 % FBS を含む differentiation RPMI1640 培地で培養し、4 日間培地交換を毎日行うことによって、ヒト ES/iPS 細胞を内胚葉細胞へ分化誘導した。ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉細胞から小腸様細胞に分化させる際には、内胚葉細胞を 5  $\mu$ mol/l 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO、GSK3 Inhibitor IX、Calbiochem)、10  $\mu$ mol/l DAPT (-secretase inhibitor、Peptide Institution)、10% Knock Serum Replacement (Invitrogen)、1 % Non Essential Amino Acid Solution (Invitrogen)、Penicillin/Streptomycin、2 mM L-Glutamine、100  $\mu$ mol/l -mercaptoethanol を含む differentiation DMEM-high Glucose 培地 (Invitrogen) にて培養を行い、培養 24 日目まで分化誘導させた。この間、培地交換は 2-3 日おきに行った。

### B.3. 定量的リアルタイム PCR

ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、ヒト iPS 細胞株 Tic から分化誘導した細胞から Total RNA を回収した。各 Total RNA を RNase-free

DNaseI (NEB) で処理した後、Superscript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて、逆転写反応を行い、Complementary DNA (cDNA) を合成した。SYBR Green gene expression assays (Applied Biosystems) を用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法を行い、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量した。GAPDH 遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。

#### B.4. FACS

ヒト iPS 細胞株 Tic を分化誘導したのち、作製された小腸上皮細胞を 1×Permeabilization Buffer (e-Bioscience) で 30 分透過処理を行った後、細胞を回収し、一次抗体ならびに二次抗体で標識した。解析は FACS LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) を用いた。

#### B.5. 電気膜抵抗値 (TEER) 測定実験

24well のチャンバー (BD Falcon) 上で培養したヒト iPS 細胞株 Tic 由来小腸上皮細胞および Caco-2 細胞における TEER 値を、Millicell (Merk millipore) を用いて測定した。

#### < 倫理面への配慮 >

研究の実施に際しては、必要に応じ、各研究機関の研究倫理審査委員会に計画を申請し、審査を受けた上で研究を進めた。また、遺伝子実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性確保に関する法律」及び、これに基づく各研究施設の組換え DNA 実験安全管理規則に則って行い、必要に応じて関連委員会に計画を申請、審査を受けた上で研究を進めた。

### C. 研究結果

#### C.1. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物誘導性評価試験の開発

本研究では、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法の改良を行った。使用する液性因子、化合物を検討し、培養期間を最適化することで、腸管上皮細胞の成熟化を試みた。化合物 A、B、C を用いることにより、ANPEP、I-FABP 等の腸管上皮マーカーの遺伝子発現量が有意に上昇した。また、化合物 A、B、C 作用させ、培養期間を 24 日から 34 日に延長することによって、腸管上皮細胞への分化誘導効率は約 20% から約 40% に上昇した。したがって、化合物 A、B、C を作用させ、培養期間を延長することで、腸管上皮細胞への分化が促進できることが示された。

#### C.2. 分化成熟の指標解析 (誘導性解析)

誘導性を薬物代謝酵素 CYP3A4、トランスポーターとして P-gp (MDR1/ ABCB1) の発現を指標として評価した。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における CYP 誘導能を評価するため、ビタミン D3 を作用させ、CYP3A4、P-gp の mRNA 量を定量した。ビタミン D3 を作用させることにより、CYP3A4 mRNA 量は約 100 倍上昇した。一方、P-gp の mRNA 量についてはほぼ変動しなかった。したがって、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いて、CYP3A4 の誘導能を評価できる可能性が示唆された。

#### C.3. 分化成熟の指標解析 (腸管上皮細胞機能解析)

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞に関して、既存の Caco-2 細胞との比較により、酵素、薬物トランスポーターの発現、トランスウエル上でタイトジャンクションの形成について評価した。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における薬

物代謝酵素 CYP3A4、薬物トランスポーター PEPT1、P-gp の遺伝子発現量を調べたところ、Caco-2 細胞よりも有意に高かった。また、トランスウエル上でタイトジャンクションを形成できるかどうか調べるために、細胞膜抵抗値を測定したところ、 $300 \cdot \text{cm}^2$  程度の値を示した。なお、コントロールとして用いた Caco-2 細胞では約  $400 \cdot \text{cm}^2$  であった。以上のことからヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は Caco-2 細胞と同様あるいはそれ以上の機能を有している可能性が示唆された。

#### D. 考察

本年度作製したプロトコルを用いることによって、約 40%の効率で腸管上皮細胞をヒト iPS 細胞から作製可能になった。今後は、腸管上皮細胞への分化誘導効率をより一層高めるために、培養条件の最適化を継続して実施する。また、本研究において CYP3A4 がビタミン D3 により誘導できることを明らかにしたが、他種の CYP 誘導剤（リファンピシン等）を用いた試験も実施する。なお、分化誘導条件を変更した際には、その都度 CYP 誘導試験を実施しなおす予定である。薬物代謝酵素 CYP3A4、薬物トランスポーター PEPT1、P-gp の発現量解析を通して、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が Caco-2 細胞よりも優れている可能性を示したが、今後は上述の薬物代謝酵素・トランスポーター以外のマーカー遺伝子を用いて Caco-2 細胞との比較を実施する。

#### E. 結論

分化誘導に使用する液性因子・化合物の最適化、分化誘導期間の延長により、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導効率の向上に成功した。今後も継続して、分化誘導法の改良

を実施することで、より高機能な腸管上皮細胞を作製したい。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

論文発表等

該当なし

学会発表等

- 1) 小澤 辰哉、高山 和雄、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之、薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月

報道発表等

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし（出願予定あり）

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果究報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

担当責任者 梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター長

研究要旨

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」において経口投与では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験に対応する腸管上皮細胞作製系の開発研究を行った。ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系において腸管細胞マーカーである CDX-2 陽性を認めた。今後は、ヒト小腸上皮における薬物代謝酵素等の誘導が担保できる in vitro 試験系構築を目指し、腸管組織機能を有する分化誘導体作製系の開発と細胞性質の評価を進めていく。

研究協力者

阿久津英憲 国立成育医療研究センター研究所  
生殖医療研究部部长

A. 研究目的

腸管組織はヒト臓器の中でも複雑な構造、機能を有する臓器であり、ヒト多能性幹細胞からの分化誘導は容易ではない。しかし、多能性幹細胞の応用は腸管組織細胞の供給を無尽蔵に、しかも体性組織検体を用いるよりも均一性質として品質管理に優れることが想定される。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験を行うことが可能となるヒト腸管上皮細胞分化誘導系の開発を行って行く。

B. 研究方法

ヒト胎児肺線維芽細胞（MRC5）由来ヒト iPS 細胞<sup>1), 2)</sup>を用いて腸管組織への分化誘導研究を行

った。良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を用いて無血清下で分化誘導を行った。分科誘導体の評価として、組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。加えて、腸管細胞マーカーである CDX-2 および E-CADHERIN 抗体を用いて免疫組織染色を行いタンパク質レベルでの発現動態を評価した。

参考文献

- 1) Nishino K, et al. Plos one 2010.
- 2) Toyoda M, et al. Genes Cells 2011.

<倫理面への配慮>

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究の実施に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、および当機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

MRC5-iPS 細胞は外胚葉・内胚葉・中胚葉の3胚葉組織へ分化することが確認されている。良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を平面培養系において無血清培地により分化誘導を行った。その分化誘導体に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ腸管上皮様構造を確認した。その固定標本に対して腸管細胞マーカーである CDX-2 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果腸管上皮様構造に CDX-2 陽性細胞が認められた(図1)。同様に E-CADHERIN も陽性となり腸管上皮様組織構造をとることが示唆された。

#### D. 考察

生体内腸管組織は粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下組織、漿膜に分かれており、吸収、免疫、蠕動といった複雑な機能を有する臓器である。腸管組織は、発生・分化・機能において複雑な器官であるが、経口薬物代謝評価系構築のためにはその分化誘導系の構築は重要である。今年度は、ヒト iPS 細胞からの腸管様構造体の作製に成功したが、次年度以降で引き続き分化誘導系開発と分化誘導体の評価をさらに行う必要がある。

#### E. 結論

発生学および組織構造学にも複雑な臓器であるヒト腸管様構造体をヒト iPS 細胞から作製することに成功した。今後は、経口薬物代謝評価系に資する観点から分化誘導系およびその作製体についてさらに知見を得る必要がある。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.: A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014; 111: E5292-5301.
- 2) Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.: Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.*, 2015; 95: 26-42.
- 3) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.: A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.*, 2014; 9: e110496.
- 4) Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.: A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.*, 2015; 95: 4-13.
- 5) Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.: Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.*, 2014; 4: 5421.
- 6) Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.: The contribution of epithelial-mesenchymal transition to

renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.*, 2015; 87: 233-238.

- 7) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K.: Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.*, 2014; 10: 632-639.
- 8) Toyoda M, Umezawa A.: Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J.*, 2014; 78: 1582-1583.

#### 学会発表等

- 1) 三木卓也, 脇谷晶一, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 西野 光一郎.: ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析 (DNA methylation kinetics in the state transition of human iPS cells). 第 8 回日本エピジェネティクス研究会 (2014.5, 東京).
- 2) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.: Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 12th Annual Meeting of ISSCR (2014.6, Vancouver, Canada).

#### 報道発表等

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

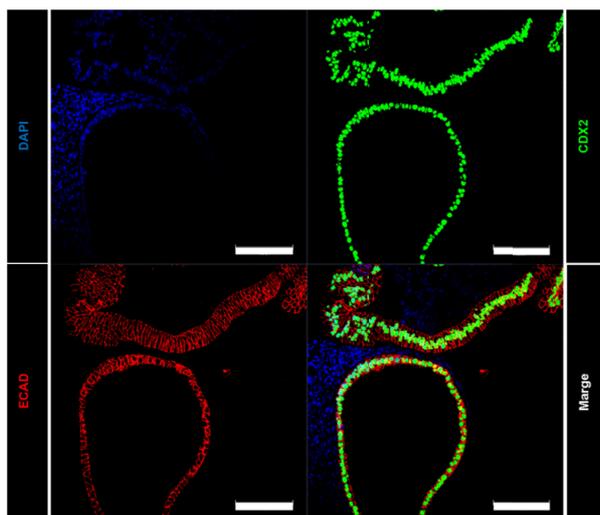


図1 ヒト iPS 細胞由来分化誘導体免疫組織染色  
CDX-2 (緑) と E-CADHERIN (赤) が腸管上皮様  
組織構造体に陽性である。細胞核 (DAPI ; 青)。  
スケールバーは 100  $\mu$ m

。

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導能予測モデルの開発

担当責任者 樋坂章博 千葉大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬の薬物相互作用の臨床試験の報告について、新規に開発された CR-Fg-IR 法を適用することにより、小腸と肝臓の代謝とその阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の CYP3A の誘導の程度が明らかになれば、in vitro の情報からそれを予測する方法論の構築が可能となる。

研究協力者

中村 己貴子 中外製薬株式会社 臨床企画推進  
部臨床薬理動態評価グループ

報告している(Hisaka A et al. Assessment of intestinal availability (FG) of substrate drugs of cytochrome p450s by analyzing changes in pharmacokinetic properties caused by drug-drug interactions. Drug Metab Dispos. 2014;42(10):1640-5). この方法を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。

<倫理面への配慮>

本解析は論文に報告された臨床試験の成績を解析対象としているので、倫理面での配慮は不要である。

A. 研究目的

薬物代謝酵素誘導能を in vitro の実験結果から小腸と肝臓の寄与を分離して予測することが本研究の最終的な目的であるが、そのためには臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する必要がある。今年度は情報が豊富な臨床試験の阻害の相互作用について、この分離を行う方法を確立することを研究の目的とした。

B. 研究方法

我々はすでに臨床試験における相互作用による AUC と消失半減期の変化から、小腸における代謝の程度を評価する新しい方法 (DDI 法) を

C. 研究結果と考察

薬物代謝酵素 CYP の誘導能の評価については、

初代培養肝細胞などを用いて mRNA の変化から判別し、必要に応じて臨床試験を実施する方法が、最近の日本のガイドライン案、あるいは米国 FDA のガイダンス案で提案されている。

また、in vitro の情報から in vivo の誘導の程度を推定する方法として、小腸と肝臓の寄与を分離して予測する方法についても同様に発表されている。しかし、実際には誘導能を肝臓と小腸で分離して評価あるいは予測した試みは in vitro、in vivo の両方についてほとんどなく、ほとんどの研究が肝臓の寄与のみを考慮している。これは小腸の寄与が in vivo でどの程度であるのか十分に評価されていないことに原因がある。本研究では iPS 細胞による評価を適用することで、これらの革新を図る計画であるが、特にこれまでほとんど注目されてこなかった小腸における相互作用の評価の意義を確認することが、研究の前提として重要である。

これまで、小腸の薬物代謝は肝移植患者を用いた臨床研究、あるいはグレープフルーツジュースに代表される小腸選択的な代謝阻害剤を用いて、一部の薬剤では肝臓に十分匹敵するほど重要であることが明らかにされている。しかし、小腸と肝臓の代謝は経口吸収後に連続的におきることから、これを分離評価することは難しかった。

今回新規に確立された方法に従い、CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。

今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の誘導の寄与が明らかになれば、in vitro の情報からそ

れを予測する方法論の構築が始めて可能となる。

#### E. 結論

CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬の薬物相互作用の臨床試験の報告について、新規に開発された CR-Fg-IR 法を適用することにより、小腸と肝臓の代謝とその阻害の程度を分離評価することに成功した。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

##### 学会発表

- 1) 樋坂章博. 薬物吸収時の小腸の代謝および輸送の定量的解析. 第 5 回杉山研究室 (理研) 公開シンポジウム(2015.2, 横浜).
- 2) Nakamura M, Koh S, Hisaka A, Suzuki H. Systematic Assessment of Intestinal Metabolism and Degree of Inhibition in Drug-drug interactions caused by Inhibition of CYP3A. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT) 2015 Annual Meeting (2015.3, New Orleans, USA).

## 様式第 19

### 学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

#### 1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬剤毒性評価技術の最前線	石田誠一	CPhI Japan 2015 (国際医薬品原料・中間体展)	2014,4	国内
iPS 細胞由来肝細胞の創薬応用の現状とその有効活用のための周辺技術	石田誠一	日本組織培養学会 第 87 回大会	2014,5	国内
iPS 細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価	石田誠一	動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会	2014,9	国内
ヒト iPS 細胞由来肝細胞の技術的課題	石田誠一	CBI 学会 2014 年大会	2014,10	国内
Evaluation of Human iPS cell-derived Hepatocytes for the Application to ADME/Tox Tests in Drug Development	Ishida S, Kubo T, Kuroda Y, Kim S, Sekino Y.	CBI 学会 2014 年大会	2014,10	国内
肝臓の代謝酵素誘導評価法の確立	石田誠一	第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて	2014,12	国内
Utility of iPS cells for drug metabolizing enzyme expression	Matsunaga T.	29th JSSX Meeting - 19th North American ISSX joint meeting	2014,10	国外
ヒト iPS 細胞由来小腸幹細胞の至適培養法の開発	壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, 松永民秀	第 66 回日本生物工学会大会	2014,9	国内

ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝臓を分化誘導する方法の開発	白木伸明	第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会	2014.12	国内
幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み	白木伸明	第 37 回日本分子生物学会	2014.11	国内
ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性	津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、桑 和彦、遠藤 文夫、桑 昭苑	第 37 回日本分子生物学会	2014.11	国内
A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells	Ogaki S, Morooka M, Otera K and Kume S.	Key Forum	2014.9	国外
S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/ iPS cells	Tsuyama T, Shiraki N, Kume S.	Key Forum	2014.9	国外
Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells	6) Otera K, Ogaki S, Kume S.	Key Forum	2014.9	国外
多能性幹細胞から消化器官を創る	桑昭苑	New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders	2014.7	国内
Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation.	Kume S.	ISSCR	2014.6	国外
Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells	Kume S	Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society	2014.6	国外

Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells	Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S.	第 12 回幹細胞シンポジウム	2014.5	国内
薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製	小澤 辰哉、高山 和雄、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之	第 37 回日本分子生物学会	2014,11	国内
ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析	三木卓也, 脇谷晶一, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 西野 光一郎	第 8 回日本エピジェネティクス研究会	2014,5	国内
Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors	Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.	2th Annual Meeting of ISSCR	2014,6	国外
薬物吸収時の小腸の代謝および輸送の定量的解析	樋坂章博	第 5 回杉山研究室 (理研) 公開シンポジウム	2015,2	国内
Systematic Assessment of Intestinal Metabolism and Degree of Inhibition in Drug-drug interactions caused by Inhibition of CYP3A	Nakamura M, Koh S, Hisaka A, Suzuki H.	American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT) 2015 Annual Meeting	2015,3	国外

2 . 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology	Zeiger E, Gollapudi B, Aardema MJ, Auerbach S, Boverhof D, Custer L, Dedon P, Honma M, Ishida S, Kasinski AL, Kim JH, Manjanatha MG, Marlowe J, Pfuhrer S, Pogribny I, Slikker W, Stankowski LF Jr, Tanir JY, Tice R, van Benthem J, White P, Witt KL., Thybaud V.	An ILSI-HESI workshop report. Environ Mol Mutagen	2014	国外
Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans	Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T.	Drug Metab Dispos	2014	国外
Histone deacetylase inhibitors promote hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells.	Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T.	PLoS One	2014	国外
Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells	Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, Matsunaga T.	Drug Metab Pharmacokinet	2014	国外

An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity	Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S.	Drug Metab Pharmacokinet	2014	国外
Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method	Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T.	Drug Metab Pharmacokinet	2014	国外
多能性幹細胞（ES細胞，iPS細胞）の利用	松永民秀，岩尾岳洋	薬剤学実験法 必携マニュアル Pharmaceutical Scientistのために -II 生物薬剤学	2014	国内
Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation	Tsuyama T, Shiraki N, Kume S	Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition	in press	国外
Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in "iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation - Methods and Protocols	Umeda K, Shiraki N, Kume S.	Methods Mol Biol	2014	国外
Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds	Yamazoe , Shiraki N, Kume S.	Methods Mol Biol.	2014	国外

Profiling of embryonic stem cell differentiation	Shiraki N, Ogaki S, Kume S.	Rev Diabet Stud.	2014	国外
Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system	Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S.	J. Mol. Cell Biol.	2014	国外
Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells	Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S.	Cell Metab	2014	国外
ES/iP 細胞を用いた内胚葉細胞（膵、肝、小腸）への分化誘導	白木伸明 条昭苑	iPS 細胞研究最前線 ー疾患モデルから臓器再生まで 医学 のあゆみ	2014	国内
ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用	坂野大介 条昭苑	『特集 器官の発生と再生の基礎』 公益財団法人金原一郎 医学医療振興財団 (医学書院) 生体の科学	2014	国内
メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している	白木伸明 条昭苑	First Author ' s	2014	国内

calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome	Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Oslowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.	Proc Natl Acad Sci U S A	2014	国外
Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material	Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.	Lab Invest	2015	国外
A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system	Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.	PLoS One	2014	国外
A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples	Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.	Lab Invest	2015	国外
Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability	Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.	Sci Rep	2014	国外

The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models	Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.	Kidney Int	2015	国外
Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells	Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K.	Nat Chem Biol	2014	国外
Stem cells bond our organs/tissues and engineering products	Toyoda M, Umezawa A.	Circ J	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式は excel 形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。